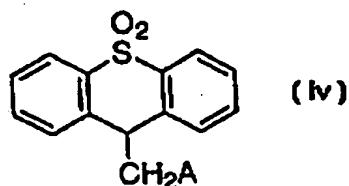
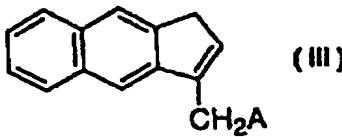
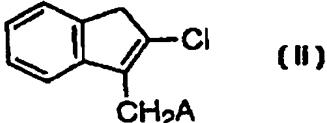
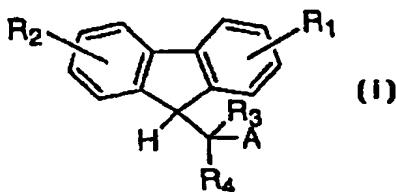




## INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(51) International Patent Classification 6 :  A61K 47/48		A2	(11) International Publication Number: <b>WO 98/05361</b>  (43) International Publication Date: 12 February 1998 (12.02.98)
(21) International Application Number: PCT/IL97/00265 (22) International Filing Date: 5 August 1997 (05.08.97)  (30) Priority Data: 119029 7 August 1996 (07.08.96) IL		(81) Designated States: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO patent (GH, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).	
(71) Applicant (for all designated States except US): YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT CO. LTD. [IL/IL]; Weizmann Institute of Science, P.O. Box 95, 76100 Rehovot (IL).  (72) Inventors; and (75) Inventors/Applicants (for US only): FRIDKIN, Matiyahu [IL/IL]; Miller Street 23, 76284 Rehovot (IL), SHECHTER, Yoram [IL/IL]; Hanassi Harishon Street 51/5, 76303 Rehovot (IL), GERSHONOV, Eytan [IL/IL]; Bnei Brith Street 17, 45265 Hod Hasharon (IL).		Published Without international search report and to be republished upon receipt of that report.	
(74) Agent: BEN-AMI, Paulina; Yeda Research and Development Co. Ltd., Weizmann Institute of Science, P.O. Box 95, 76100 Rehovot (IL).			

(54) Title: LONG-ACTING DRUGS AND PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS COMPRISING THEM



## (57) Abstract

Prodrugs and pharmaceutically acceptable salts thereof are provided carrying functional groups sensitive to mild bases and capable of slowly hydrolyzing to the original active drug molecule under physiological conditions. The prodrugs are preferably of the formula X-Y wherein Y is a moiety of a drug bearing at least one functional group selected from free amino, carboxyl, hydroxyl and/or mercapto, and X is a radical selected from radicals of formulas (i) to (iv) wherein R<sub>1</sub> and R<sub>2</sub>, the same or different, are each hydrogen, alkyl, alkoxy, alkoxyalkyl, aryl, alkaryl, aralkyl, halogen, nitro, sulfo, amino, ammonium, carboxyl, PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>, or OPO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>; R<sub>3</sub> and R<sub>4</sub>, the same or different, are each hydrogen, alkyl or aryl; and A is a covalent bond when the radical is linked to a carboxyl or mercapto group of the drug Y, or A is OCO- when the radical is linked to an amino or hydroxyl group of Y, and pharmaceutically acceptable salts thereof. Examples of such prodrugs are those wherein Y is a moiety of insulin, human or bovine growth hormone, antibiotics, propanolol and others.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	マークド <sup>8</sup> (参考)
A 6 1 K 47/48		A 6 1 K 47/48	
38/28		A 6 1 P 3/10	
A 6 1 P 3/10		9/12	
9/12		29/00	
29/00		31/02	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 59 頁) 最終頁に統く

(21)出願番号	特願平10-507770	(71)出願人	イエダ リサーチ アンド デベロップメント カンパニー リミテッド イスラエル国 76 100 レホボト, ピー. オー. ボックス 95, ワイズマン インスチチュート オブ サイエンス
(86) (22)出願日	平成9年8月5日(1997.8.5)	(72)発明者	フリドキン, マチヤフ イスラエル国76284 レホボト, ミラー ストリート 23
(85)翻訳文提出日	平成11年2月8日(1999.2.8)	(72)発明者	シェチター, ヨラム イスラエル国76303 レホボト, ハナシ ハリスホン ストリート 51/5
(86)国際出願番号	PCT/IL97/00265	(74)代理人	弁理士 浅村 皓 (外3名)
(87)国際公開番号	WO98/05361		
(87)国際公開日	平成10年2月12日(1998.2.12)		
(31)優先権主張番号	119029		
(32)優先日	平成8年8月7日(1996.8.7)		
(33)優先権主張国	イスラエル(IL)		

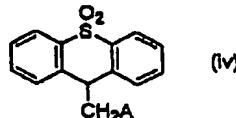
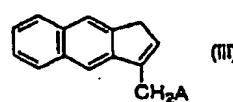
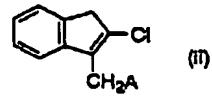
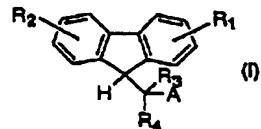
最終頁に統く

## (54)【発明の名称】長期作用型薬物およびこれらを含む薬剤組成物

## (57)【要約】

脂やかな塩基性に対して感受性であり、生理学的条件下でその元の活性な薬物分子にゆっくり加水分解されることができる官能基を有する、プロドラッグおよびその薬剤学的に許容される塩が提供される。プロドラッグは好ましくは、式X-Y [式中、Yは、遊離アミノ、カルボキシル、ヒドロキシルおよび/またはメルカブトから選択される少なくとも1つの官能基を有する薬物の残基であり、そしてXは、式 (I) ~ (IV) (式中、R<sub>1</sub>およびR<sub>2</sub>は、同一であるかまたは異なって、それぞれ水素、アルキル、アルコキシ、アルコキシアルキル、アリール、アルカリール(alkaryl)、アラルキル、ハロゲン、ニトロ、スルホ、アミノ、アンモニウム、カルボキシル、PO<sub>2</sub>H<sub>2</sub>、またはOPO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>であり；R<sub>3</sub>およびR<sub>4</sub>は、同一であるかまたは異なって、それぞれ水素、アルキルまたはアリールであり；そしてAは、このラジカルが薬物Yのカルボキシルまたはメルカブト基に結合しているとき共有結合であるか、あるいはAは、このラジカルがYのアミノまたはヒドロキシル基に結合しているときOCO-である)のラジカルから選択されるラジ

カルである]で示され、およびその薬剤学的に許容される塩である。そのようなプロドラッグの例は、Yが、インスリン、ヒトまたはウシ成長ホルモン、抗生物質、プロラノロールなどの残基であるものである。



## 【特許請求の範囲】

1. プロドラッグ中では、元の薬物分子の少なくとも1つの遊離アミノ、ヒドロキシ、メルカプト、および／またはカルボキシル基が、穏和な塩基に対して感受性で穏やかな塩基性（例えば、生理学的）条件下で脱離可能な官能基により置換されている、生理学的条件下で元の活性な薬物分子にゆっくり加水分解することができるプロドラッグまたはその薬剤学的に許容される塩。

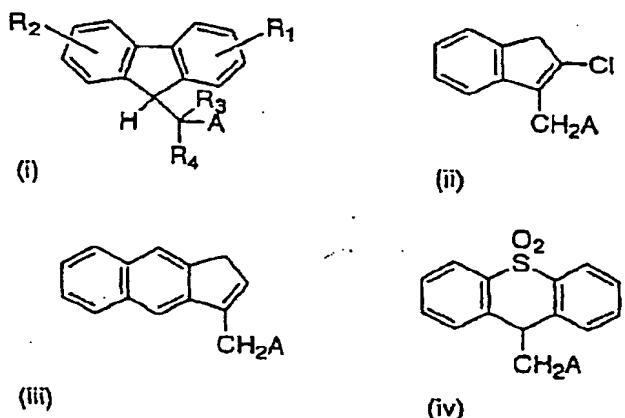
2. 式：



[式中、

Yは、遊離アミノ、カルボキシル、ヒドロキシルおよび／またはメルカプトから選択される少なくとも1つの官能基を有する薬物の残基であり、そして

Xは、式(i)～(iv)：



(式中、R<sub>1</sub>およびR<sub>2</sub>は、同一であるかまたは異なって、それぞれ水素、アルキル、アルコキシ、アルコキシアルキル、アリール、アルカリール(alkaryl)、アラルキル、ハロゲン、ニトロ、スルホ、アミノ、アンモニウム、カルボキシル、PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>、またはPO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>であり；R<sub>3</sub>およびR<sub>4</sub>は、同一であるかまたは異なる

って、それぞれ水素、アルキルまたはアリールであり；そしてAは、このラジカルが薬物Yのカルボキシルまたはメルカプト基に結合しているとき共有結合であるか、あるいはAは、このラジカルがYのアミノまたはヒドロキシル基に結合し

ているときOOC-である)のラジカルから選択されるラジカルである]で示される、請求の範囲第1項記載のプロドラッグ、またはその薬剤学的に許容される塩。

3. Yは、抗糖尿病薬、抗生物質、合成抗菌薬、鎮痛薬および抗炎症薬、抗アレルギーおよび抗ヒスタミン薬、抗高コレステロール血症薬、 $\beta$ -アドレナリン作用遮断薬および抗高血圧薬、抗新生物薬、および抗ウイルス薬よりなる群から選択される、ヒトおよび獣医学的使用のための薬物の残基である、請求の範囲第2項記載のプロドラッグ。

4. Yは、ラジカル(i) (ここで、R<sub>1</sub>、は水素またはスルホであり、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>およびR<sub>4</sub>は、水素である)からなる少なくとも1つのラジカルXにより置換されている、請求の範囲第2項記載のプロドラッグ。

5. Yは、インスリン分子の遊離アミノおよび/またはカルボキシル基、および隨時遊離ヒドロキシル基が、少なくとも1つの該ラジカル(i)により置換されている、インスリンの残基である、請求の範囲第4項記載のプロドラッグ。

6. 1つまたはそれ以上のアミノ基が、9-フルオレニルメトキシカルボニルラジカル(i) (ここで、R<sub>1</sub>～R<sub>4</sub>は水素であり、AはOOC- (本明細書ではN-(Fmoc)-インスリン)である)により置換されている、請求の範囲第5項記載のインスリン誘導体。

7. 1つまたはそれ以上のカルボキシル基が、9-フルオレニルメチルラジカル(i) (ここで、R<sub>1</sub>～R<sub>4</sub>は水素であり、Aは共有結合 (以後C-(Fm)-インスリン)である)により置換されている、請求の範囲第5項記載のインスリン誘導体。

8. 1つまたはそれ以上のアミノ基がFmocラジカルにより置換され、1つまたはそれ以上のカルボキシル基が、Fmラジカル (本明細書ではN-(Fmoc)、C-(Fm)-インスリン)により置換されている、請求の範囲第5項記載のインスリン誘導体。

9. 1つまたはそれ以上のカルボキシル基がFmラジカルにより置換され、1つまたはそれ以上のヒドロキシル基が、Fmocラジカル (本明細書ではC-(

Fm)、N-(Fmoc) -インスリン)により置換されている、請求の範囲第5項記載のインスリン誘導体。

10. 1つまたはそれ以上のアミノおよびヒドロキシル基がFmocラジカルにより置換され、1つまたはそれ以上のカルボキシル基が、Fmラジカル(本明細書ではN, O-(Fmoc)、C-(Fm) -インスリン)により置換されている、請求の範囲第5項記載のインスリン誘導体。

11. Gly<sup>A1</sup>、Phe<sup>B1</sup>、またはLys<sup>B29</sup>位の遊離アミノ基で1~3個のFmoc置換基を有する、請求の範囲第5項記載のインスリン誘導体であって、AとBは、Gly<sup>A1</sup>-N-(Fmoc) -インスリン、Phe<sup>B1</sup>-N-(Fmoc) -インスリン、Lys<sup>B29</sup>-N-(Fmoc) -インスリン、Gly<sup>A1</sup>、Phe<sup>B1</sup>-N-(Fmoc)<sub>2</sub>-インスリン、Gly<sup>A1</sup>、Lys<sup>B29</sup>-N-(Fmoc)<sub>2</sub>-インスリン、およびGly<sup>A1</sup>、Phe<sup>B1</sup>、Lys<sup>B29</sup>-N-(Fmoc)<sub>3</sub>-インスリンからなるインスリン誘導体の群から選択される、インスリン分子の鎖である、上記誘導体。

12. Gly<sup>A1</sup>、Phe<sup>B1</sup>、またはLys<sup>B29</sup>位の遊離アミノ基で1~3個の2-スルホ-Fmoc(本明細書では、Sulfmoc)置換基を有する、請求の範囲第5項記載のインスリン誘導体であって、AとBは、Gly<sup>A1</sup>-N-(Sulfmoc) -インスリン、Phe<sup>B1</sup>-N-(Sulfmoc) -インスリン、Lys<sup>B29</sup>-N-(Sulfmoc) -インスリン、Gly<sup>A1</sup>、Phe<sup>B1</sup>-N-(Sulfmoc)<sub>2</sub>-インスリン、Gly<sup>A1</sup>、Lys<sup>B29</sup>-N-(Sulfmoc)<sub>2</sub>-インスリン、およびGly<sup>A1</sup>、Phe<sup>B1</sup>、Lys<sup>B29</sup>-N-(Sulfmoc)<sub>3</sub>-インスリンからなるインスリン誘導体の群から選択される、インスリン分子の鎖である、上記誘導体。

13. インスリンは、本来の、組換えまたは突然変異したヒト、ウシ、またはブタインスリンである、請求の範囲第5項~第12項までのいずれか1項に記載

の(Fmoc、SulfmocまたはFm) -インスリン誘導体。

14. ヒトおよびウシ成長ホルモンから選択される Fmoc-成長ホルモン。
15. N-Fmoc-セフェレキシンおよびセフェレキシンフルオレニルメチルエステルから選択される Fmoc セフェレキシン。
16. ジー(フルオレニルメトキシカルボニル)-ポリミキシンB.
17. ピペラシンフルオレニルメチルエステル。
18. Fmoc-プロプラノロール。
19. 請求の範囲第1項～第18項までのいずれか1項に記載のプロドラッグを含む薬剤組成物、またはその薬剤学的に許容される塩、および薬剤学的に許容される担体。
20. 請求の範囲第5項～第13項までのいずれか1項に記載の N-(Fmoc)-インスリンを含む、請求の範囲第1.9項記載の薬剤組成物。
21. 本来のまたは組換えヒト N-(Fmoc)<sub>3</sub>-インスリンおよび／または、本来のおよび／または組換えヒト N-(Fmoc)<sub>2</sub>-インスリンを含む、請求の範囲第20項記載の薬剤組成物。
22. 皮下注射、経皮または経口投与のための、請求の範囲第19項～第21項までのいずれか1項に記載の薬剤組成物。
23. 薬剤組成物の製造のための請求の範囲第1項～第18項までのいずれか1項に記載のプロドラッグの使用。
24. 請求の範囲第5項～第13項までのいずれか1項に記載の1つまたはそれ以上のインスリン誘導体の有効量を、糖尿病患者に投与することを特徴とする、糖尿病の治療方法。
25. 有効量の N-(Fmoc)<sub>2</sub>-インスリンおよび N-(Fmoc)<sub>3</sub>-インスリンが、5～8日間隔で患者に投与される、請求の範囲第24項記載の方法。
26. N-(Fmoc)-インスリンは皮下注射により投与される、請求の範囲第24項または第25項記載の方法。
27. インスリンは毎日投与されることをさらに含む、請求の範囲第24項～第26項までのいずれか1項に記載の方法。

**【発明の詳細な説明】****長期作用型薬物およびこれらを含む薬剤組成物****発明の分野**

本発明は、不活性型から生物活性型への体内での化学変換を受けることが可能な新規な長期作用型プロドラッグ（該プロドラッグは、穏やかな塩基性条件に対して感受性の官能基を有する）、さらに詳しくはフルオレニルメトキシカルボニル（Fmoc）-およびフルオレニルメチル（Fm）-置換プロドラッグ、およびこれらを含む薬剤組成物に関する。

**発明の背景**

ヒトの治療および獣医学的治療の両方に現在使用されている治療用薬物は、種種の基準により分類することができる。例えば、薬物はタンパク性-ペプチド性を有する分子（すなわち、アミノ酸構成単位からなる）または非ペプチド性を有する分子として、あるいは経口吸収されるか、または血液循環に到達させるために他の様式（すなわち、注射、鼻内または局所的）により投与される薬物のような構造とは無関係の基準により、分類することができる。

経口吸収される化合物は、一般に、低分子量の、どちらかと言えば安定で、親油性（「油性」）かつ非ペプチド性のものである。事実上全てのペプチド性およびタンパク質薬物は、それらの固有の親水性（非親油性）および極性、および代謝的不安定性のため、これらの基準に従わず、大体注射により投与する必要がある。さらに、これらの分子は、多様な機作、特にタンパク質分解により体内で迅速に分解されるため、通常短命な分子種である。

非ペプチド性薬物は、しばしば充分に疎水性であり、胃腸管経路により血液循環に到達させることができる。これらの相対的化学安定性のため、非ペプチド性薬物は通常長命な種である。

タンパク質およびペプチド薬物には、主要かつ多くの臨床的用途を有する（例えば、糖尿病の治療におけるインスリン、前立腺癌の治療におけるゴナドトロピン放出ホルモン（GnRH）類似体、骨関連障害の治療におけるカルシトニン）。

この最も重要な分子のファミリーのポテンシャルは大きいが、未だほんのわずかではないにしても部分的にしか探求されていない。これは、大部分はこれらが体内で短命であり、投与の様式の不便さのためである。抗生物質のような非ペプチド性薬物は比較的長命であるが、目的の循環レベルを継続して維持するためには1日数回水1週間にわたって（またはそれ以上）投与する必要がある。

薬物の経口吸収は、ヒトの疾患の治療、特に長期治療における非常に望ましい目標である。薬物の構造変更は、経口および局所吸収、生物学的安定性、および最終的に生物学的利用能の増大をもたらすことがある。現在こういった目標に大きな努力が向けられている。大部分のアプローチでは、その本来の構造（すなわち生物活性構造）が保存されるように薬物を修飾する。この本来の構造は、薬物の標的により特異的に認識される構造であり、かつ薬物の効力の必要不可欠な特徴である。しかし残念ながら多くの場合に、本来の構造はまた、「清掃機械システム(clearing machinery system)」（これは、薬物を結合し、薬物を分解または代謝することができ、そして薬物の廃棄を促進する）によっても認識される。従って、代謝安定性を増強するための要求と同時に、しばしば生物活性構造の安定化が試みられる。カプセル化、溶解度の低下および化学修飾のような方法が、この目標を達成するために用いられている。

抗生物質、抗ウイルス薬、抗高血圧薬、抗炎症薬、鎮痛薬、抗コレステロール血症薬、抗癌薬、抗糖尿病薬、成長促進薬、および他の薬物を含む、市販されているか、または将来開発されるであろう実質的に多く（全てではないが）のペプチド性および非ペプチド性薬物の半減期を延長することは非常に望ましい。ある閾値濃度以上で毒性である本来の薬物に関連するプロドラッグは、特に有益であろう。

### 発明の要約

従って本発明の目的は、穏やかな塩基性条件に対するその高い感受性、および体内の生理学的条件下で不活性型から生物活性型への変換を受けることができるその能力、を特徴とする新規なプロドラッグを提供することである。

本発明の別の目的は、遊離アミノ基、カルボキシル基、ヒドロキシル基および／またはメルカプト基を有する薬物から得られるプロドラッグであって、本質的

に生物学的に非活性であるが、投与後体内で自発的かつ緩徐に元の活性薬物分子に変換されることができるプロドラッグを提供することである。

本発明のさらに別の目的は、より高い代謝安定性および増大した生物学的利用能を示すプロドラッグを提供することである。

本発明のさらなる目的は、薬物投与の代替的可能性（例えば、経口および経皮）を示す、かつさらに生理学的障壁（例えば、脳血管閥門）を貫通することができるプロドラッグを提供することである。

本発明のさらに他の目的は、体内の患部への特異的薬物ターゲティングを可能にするプロドラッグを提供することである。

従って本発明は、ある薬物から得られる誘導体化された新規なプロドラッグであって、遊離アミノ、カルボキシル、ヒドロキシルおよび／またはメルカプトを含む基から選択される該薬物分子の1つまたはそれ以上の基が、塩基に対して感受性で、穏やかな塩基性（例えば、生理学的）条件下で脱離可能な官能基により置換されている、新規なプロドラッグに関する。

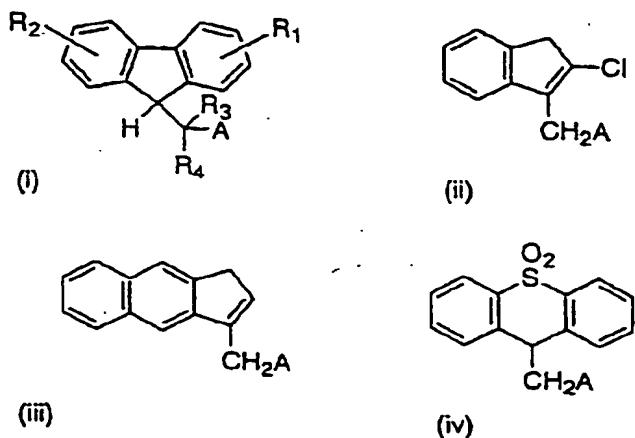
除放性薬物のための本発明の新しい概念は、新規な、一般に疎水性のより高い薬物誘導体への誘導体化を含む。このアプローチにおいて、本来のコンホメーション、生物学的効力、および分解系によるその薬物の同一性の認識は、保存するよりもむしろ喪失することが好ましい。しかしこのアプローチの利点は、こうして修飾される誘導体が、インビボ条件下で緩徐かつ自発的に加水分解して本来の活性薬物に戻ることができるという事実にある。

具体的な実施態様において、本発明のプロドラッグは、式：

X-Y

[式中、

Yは、遊離アミノ、カルボキシル、ヒドロキシルおよび／またはメルカプトから選択される少なくとも1つの官能基を有する薬物の残基であり、そしてXは、式(i)～(iv)：



(式中、 $R_1$ および $R_2$ は、同一であるかまたは異なって、それぞれ水素、アルキル、アルコキシ、アルコキシアルキル、アリール、アルカリール(alkaryl)、アラルキル、ハロゲン、ニトロ、スルホ、アミノ、アンモニウム、カルボキシル、 $PO_3H_2$ 、または $PO_3H_2$ であり； $R_3$ および $R_4$ は、同一であるかまたは異なって、それぞれ水素、アルキルまたはアリールであり；そして $A$ は、このラジカルが薬物 $Y$ のカルボキシルまたはメルカプト基に結合しているとき共有結合であるか、あるいは $A$ は、このラジカルが $Y$ のアミノまたはヒドロキシル基に結合しているとき $OCO-$ である)のラジカルから選択されるラジカルである]で示されるものである。

本発明において、 $Y$ は、遊離アミノ、カルボキシル、ヒドロキシルおよび/またはメルカプトから選択される少なくとも1つの官能基を有する、ヒトおよび獣医学的使用のための任意の薬物〔例えば、抗糖尿病薬(例えば、インスリン)；成長促進薬(例えば、ヒト成長ホルモン、ウシ成長ホルモン)；アミノグリコシド(例えば、ゲンタマイシン、ネオマイシンおよびストレプトマイシン)、ペニシリン(例えば、アモキシシリン、アンピシリン、ピペラシリン)およびセファロスポリン(例えば、セファクロール、セフミノックス(cefminox)およびセファレキシン)のような $\beta$ -ラクタム、マクロライド(例えば、カルボマイシンおよびエリスロマイシン)、およびポリペプチド性抗生物質(例えば、バシトラシン、グラミシジンおよびポリミキシン)のような抗生物質；合成抗菌物質(例えば、トリメトプリム、ピロミジン酸(piromidic acid)、およびスルファメタジ

ン) ; 鎮痛薬および抗炎症薬 (例えば、アセトアミノフェン、アスピリン、イブフェナック、インドメタシン) ; 抗アレルギーおよび抗ヒスタミン薬 (例えば、アムレキサノックス (amlexanox) およびクロモリン) ; 抗高コレステロール血症薬 (例えば、クロフィブリン酸、オキシニアシン酸 (oxiniacic acid) およびトリパラノール) ;  $\beta$ -アドレナリン作用遮断薬および抗高血圧薬 (例えば、ブチラノロール (bupranolol) 、カプトプリル、インデノロール (indenolol) 、プロプラノロールおよび4-アミノブタン酸) ; 抗新生物薬 (例えば、ダウノルビシン、アザシチジン、6-メルカプトプリン、インターフェロン、インターロイキン-2、メソトレキセート、タキソールおよびビンプラスチン) ; 抗ウイルス薬 (例えば、アシクロビル、ガンシクロビル、アマンタジン、インターフェロン、AZT およびリバビリン (ribavirin) ) など (これらに限定されない) ] の残基である。本発明の薬物という用語は、フェロモンをも包含する。

本明細書の  $R_1$  、  $R_2$  、  $R_3$  および  $R_4$  の定義の中の「アルキル」、「アルコキシ」、「アルコキシアルキル」、「アリール」、「アルカリール」および「アラルキル」という用語は、1~8個、好ましくは1~4個の炭素原子のアルキルラジカル、例えば、メチル、エチル、プロピル、イソプロピルおよびブチル、および6~10個の炭素原子のアリールラジカル、例えば、フェニルおよびナフチルを示すために使用される。「ハロゲン」という用語は、ブロモ、フルオロ、クロロおよびヨードを含む。

本発明の好ましい実施態様において、官能基は、ラジカル (i) (ここで、  $R_1$  、  $R_2$  、  $R_3$  および  $R_4$  は、水素であり、そしてAは、OCO-である) 、すなわち、アミノ基の一時的可逆的保護のためにペプチド合成において広く使用される、周知の9-フルオレニルメトキシカルボニル (Fmoc) ラジカルである (総説についてはエル・エー・カーピノ (L.A. Carpino) , Acc. Chem. Res. (1987) 20, 401-407を参照のこと)。Fmoc基は、その導入と脱離のための有利な合成操作、およびペプチド合成と便利な精製のため

に必要不可欠なものとしての選択的安定性のために、ペプチド合成には特に適している。さらには、関連する9-フルオレニルメチル (Fm) 基も、カルボン酸

官能基（例えば、アミノ酸）の可逆的マスキングに適用可能である。得られる9-フルオレニルメチルエステル（Fm-エステル）は、穏やかな塩基処理により $\beta$ -脱離反応経路により親の遊離カルボン酸官能基を生じさせるため、同様に薬物のカルボン酸官能基の可逆的マスキングに使用することができる。Fmoc基はさらに、チロシン、セリンおよびトレオニンのヒドロキシル基の可逆的保護において同様に使用することができる。

ハロゲン化Fmocラジカル（i）（ここで、R<sub>1</sub>およびR<sub>2</sub>の少なくとも1つは、2位または7位がハロゲン、好ましくはClまたはBrである）、2-クロロ-1-インデニルメトキシカルボニル（CLIMOC）ラジカル（ii）、1-ベンゾ[f]インデニルメトキシカルボニルウレタン（BIMOC）ラジカル（iii）、ウレタンスルホンラジカル（iv）および対応するラジカル（i）～（iv）（ここで、Aは、共有結合である）は、薬物の遊離アミノ、カルボキシル、ヒドロキシルおよびメルカプト官能基の置換にFmocおよびFmと同様に使用することができ、そして塩基性（例えば、生理学的）条件下でのこのような基の脱離に対する広範な感受性を提供することができる。実際、上記ラジカル（i）～（iv）は、中性またはわずかにアルカリ性pHおよび穏やかな条件での加水分解を受けるまれな化学物質の一般的ファミリーに属するもので、従って $\alpha$ -および $\epsilon$ -アミノ基の一時的可逆的保護に、例えば、ペプチド合成において使用することができ、そして穏やかな塩基性条件下で $\beta$ -脱離反応によりアミノ官能基から脱離することができる。

本発明ではラジカル（i）～（iv）、好ましくはアミノおよび/またはヒドロキシル残基に共有結合したFmoc、またはカルボキシルおよび/またはメルカプト残基に共有結合したFmは、体液の生理学的条件（すなわちpH 7.4および37°C）下で、加水分解（ $\beta$ -脱離による）を受けて遊離アミノ、ヒドロキシル、メルカプトまたはカルボキシル官能基に戻る。

本発明のプロドラッグは、ラジカル（i）～（iv）を含む適切な試薬との薬物分子の反応により調製することができる。アミノ官能基に非常に特異的な試薬の

9-フルオレニルメチル-N-ヒドロキシスクシンイミド（Fmoc-Osu）

；アミノおよびヒドロキシルラジカルと反応して共有結合する、9-フルオレニルメトキシカルボニルクロリド (Fmoc-C1) ; メルカプトラジカルと反応してS-Fm誘導体を与える9-クロロメチルフルオレン (Fm-C1) (ボダンスキー (Bodanszky) とベドナレック (Bednarek) 、1982年) ; およびカルボキシル官能基と反応してエステル化する9-フルオレニルメタノール (Fm-OH) のような、9-フルオレニルメチル (Fm) のいくつかの誘導体が利用可能である。

$\beta$ -脱離とは異なる経路によりアミノ、カルボキシル、ヒドロキシルまたはメルカプト官能基から脱離することができる、塩基性条件に感受性の官能基も利用可能であるが、これらは通常薬物の保護には妥当でない大規模な操作を必要とする。知られている1つの例外は、トリフルオロアヤチル基 (TFA) であり、これは、アミノ基からの容易な脱離においてFmocと同等であるが、潜在的に毒性であるため、TFA誘導体化薬物は、治療目的には推奨されない。これに反してFmoc-アミノ酸 (Fmoc-ロイシン) は、実験動物モデルにおいて低い毒性の指標を示した (バーチ (Burch) ら、1991年)。

本発明はさらに、本発明のプロドラッグおよび薬剤学的に許容される担体を含む、薬剤組成物に関する。

#### 図面の簡単な説明

図1は、無細胞生物学的測定法 (インスリン受容体チロシンキナーゼの濃縮調製物による [ポリ (Glu<sub>4</sub> Tyr)] のリン酸化) により求めた、Lys<sup>B29</sup>-N-(Fmoc)<sub>1</sub>-インスリン (黒四角) 、Phe<sup>B1</sup>、Lys<sup>B29</sup>-N-(Fmoc)<sub>2</sub>-インスリン (白四角) およびGly<sup>A1</sup>、Phe<sup>B1</sup>、Lys<sup>B29</sup>-N-(Fmoc)<sub>3</sub>-インスリン (3つ全てのアミノ基に置換、白丸) のいずれかの活性化 (pH 7.4、37°C) の経時変化を示す。

図2は、正常ラットの血液グルコースレベルに及ぼす (Fmoc)<sub>2</sub>-インスリン (2ml 10%DMSO中3mg/ラット) およびNPH-インスリン (3mg/ラット) の単回腹腔内投与の作用を示す。

図3は、正常ラットの血液グルコースレベルに及ぼす (Sulfonyl-Fmoc)<sub>2</sub>-

インスリンおよび本来のインスリン（両方とも 1 ml 水中 3 mg／ラット）の単回腹腔内投与の作用を示す。

図 4 は、トリプシンとキモトリプシンの混合物によるインスリン（白四角）および Gly<sup>A1</sup>, Phe<sup>B1</sup>, Lys<sup>B29</sup>-N-(Fmoc)3-インスリン（黒菱形）の分解を示す。

図 5 は、本来のインスリン投与（白四角）に比較した、糖尿病ストレプトゾトシン（streptozotocin）（STZ）処理ラットの血液グルコースレベルに及ぼす単回 Gly<sup>A1</sup>, Phe<sup>B1</sup>, Lys<sup>B29</sup>-N-(Fmoc)3-インスリン投与（黒丸）の作用を示す。

図 6 は、STZ処理高血糖症ラットへの Phe<sup>B1</sup>, Lys<sup>B29</sup>-N-(Fmoc)2-インスリンの単回投与が、血液グルコースレベルを下げる持続作用を誘導することを示す。

図 7 は、インキュベーションによる活性プロプラノロールの生成による、N-Fmoc-プロプラノロールの  $\beta$ -アドレナリン拮抗能力を示す。

#### 発明の詳細な説明

本発明は、薬物投与のよりよい経路を開発するための新規な概念により設計された、そしてその結果薬物安定性および生物活性が増強された、プロドラッグに関する。本発明の新規なアプローチでは、薬物の本来の構造、生物学的効力および標的認識能力は保存されているよりもむしろ喪失されるのが好ましいが、適用後は、こうして修飾された薬物は、体内で元の活性分子に自発的かつ緩徐に変換して戻る。

本発明の新規な概念により、現在適用されている多くの薬物は、生物内での全身性の受容体介在性分解を回避するため長命種である不活性プロドラッグに変換することができる。本発明のプロドラッグは、インビボの生理学的条件および均質な方法で元の薬物への自発的再生を受けるように設計される。本発明のプロドラッグの製造に利用可能な広い範囲の化学操作により、必要に応じて速い速度または遅い速度の再生が得られる。このため所定のプロドラッグは、溶解度が低く、従って s. c. 吸収の速度が遅いというような物理特性を有するように調製することができる。さらに、循環血中の自発的再生の特性と組合せた、プロドラッグ

グ

の疎水性指数の変更により、経口で非吸収性薬物の胃腸透過性プロドラッグに変換することができる。

本発明のプロドラッグは、ヒトと動物に使用するための修飾薬物だけでなく、修飾昆虫フェロモンをも含む。

本発明の1つの側面において、プロドラッグは修飾インスリンである。現在インスリンは、高血糖症、脂質、炭水化物およびタンパク質の代謝の変調および血管疾患からの合併症のリスクの上昇を特徴とする症候の群である糖尿病の支配的な薬物である。多くの患者は、インスリン依存性（I D D M、I型）またはインスリン非依存性糖尿病（N I D D M、II型）として臨床的に分類することができる。西洋世界では約90%の糖尿病患者は、II型糖尿病であり、残りの多くはI型である。米国のII型糖尿病の約70%は、インスリン耐性に顕著に寄与する因子である肥満である。I型糖尿病では、膵 $\beta$ -細胞の広範な選択的喪失および低インスリン血症の状態がある。対照的にII型糖尿病患者では膵島からの $\beta$ -細胞の顕著な喪失はなく、これらの患者では24時間にわたるインスリンの平均血漿濃度は、本質的に正常であるか、またはホルモンの作用に対する末梢抵抗のために上昇していることさえある。それにもかかわらず、II型糖尿病の個人は、相対的にインスリンが欠乏している。これは、正常な膵 $\beta$ -細胞が、高血糖症に直面したとき正常よりかなり多いインスリンを分泌することができるからであり、このためインスリンに対する中程度の耐性にもかかわらず個人を正常血糖に維持することができる。

事実上全ての型の糖尿病は、インスリンの作用と反対の作用を有する過剰なホルモン（グルカゴン、成長ホルモン、コルチゾール、およびカテコールアミン）と関係する、インスリンの循環濃度の低下（インスリン欠乏）またはインスリンに対する末梢組織の応答の低下（インスリン耐性）のいずれかのせいである。これらのホルモン異常により、炭水化物、脂質、ケトンおよびアミノ酸の代謝が変化する。この症候群の中心的な特徴は、高血糖である。

血漿中のインスリンの半減期は、約5~6分である。インスリンの分解は、主

に肝臓で起こり、少ない量で腎臓と筋肉でも起こる。門脈で肝臓に到達するインスリンの約50%は分解されて、全身循環には到達しない。インスリンは腎糸球

体により濾過され、尿細管（これもインスリンを分解する）により再吸収される。

肝臓におけるインスリンのタンパク質分解は、主として受容体介在性である。インスリン受容体結合後、複合体はエンドソームと呼ばれる小胞中に内在化し、ここで分解が開始する。あるインスリンはまた、分解のためにリソソームに送達される。肝細胞では、内在化したインスリンの約50%が分解される。

インスリンは、糖尿病のケトアシドーシスの管理に決定的に重要であり、そして高血糖性非ケトン性昏睡の治療、ならびにI型およびII型糖尿病患者両方の手術中の管理において重要である。インスリンの皮下（s. c.）投与は、食餌および／または経口低血糖薬により適切に制御されない全てのI型患者および多くのII型糖尿病患者の基本的治療である。全ての症例において、目標は、血液グルコースだけでなく、低インスリン血症および高血糖症に由来する不均衡な代謝の全ての他の側面をも正常化することである。

主としてインスリンのs. c. 投与に基づく長期治療は、注入される栄養に応答してのインスリン分泌の正常な急速上昇と下降を模倣せず、そしてインスリンの肝臓の作用よりもむしろ選択的末梢作用を有するが、それにもかかわらずこの治療によりかなり成功している。

s. c. 適用のために以前から利用されているインスリン製剤は、作用の持続時間により、短期、中期または長期作用性インスリンに分類され、そして元の種により分類される。ヒトインスリンは、今や広く利用可能であり、理論上は、ブタまたはウシインスリンよりも免疫原性が低いことが期待される（最後の2つのインスリンは、それぞれ1つおよび3つのアミノ酸がヒトインスリンと異なる）。しかし高度に精製すると、3つ全てのインスリンが、免疫応答を刺激する低いが測定可能な能力を有する。中性pH値での調製は、一般に安定であり、室温で長期の保存が可能である。従来の目的および治療目的のためには、インスリンの用量および濃度は、絶食ウサギに標準血糖を誘導するのに必要な量に基づく単位

(U) で表される。インスリンの均質な製剤は、約 25U/mgを含有する。

短期または迅速作用性インスリンは、通常食事の 30~45 分前に注射される、中性 pH 緩衝液に溶解した結晶性亜鉛インスリンの可溶性製剤である。これらの製剤は、最も迅速に作用が開始し、最も持続時間が短い。

安定な代謝条件下では、標準的インスリンは通常、中期、または長期作用性製剤と一緒に投与される。中期作用性インスリンは、水溶液には溶解性が低くなるように設計されたものであり、そのため皮下投与すると緩徐に溶解し、そしてその作用の持続時間は長い。最も頻繁に使用される 2 つの製剤は、硫酸プロタミンの添加により修飾されたリン酸緩衝液中の亜鉛インスリン結晶の懸濁液である、NPH インスリン (NPH は、ニュートラルプロタミンハーゲドルン (Neutral Protamine Hagedorn) を表す)、およびインスリンの溶解度を最小化するために塩化亜鉛の添加により修飾された酢酸緩衝液中のインスリンの懸濁液である、レンテ (Lente) インスリンである。

短期作用性インスリンは、0.4~7 時間作用することが期待されるため、そして中期作用性インスリンは、1.5~20 時間の範囲で作用しうるため、2 つのインスリンの組合せの正しいタイミングと用量には、反調節ホルモン (インスリンに対する) の活性が上がるとき、栄養学的性質、夜間 (絶食) 低血糖、および早朝高血糖のような可変パラメーターを考慮する必要がある。迅速作用性および長期または中期作用性インスリン製剤が同時投与されるならば、このような組合せの共通の不都合は、混合することにより、迅速作用性インスリンのいくつかは、長期または中期作用性製剤の過剰な  $Zn^{2+}$  またはプロタミンと錯体を形成し、そのため中期およびさらには長期作用性インスリンに変換することもある。

ウルトラレンテ (Ultralente) インスリンまたは延長亜鉛インスリンまたはプロタミン亜鉛インスリン懸濁液のような長期作用性インスリンは、インスリンの不溶性製剤を達成するために亜鉛、または亜鉛 + プロタミンが過剰に添加されたインスリン製剤である。これらは、亜鉛インスリンの微細な粒子の懸濁液であり、これらの作用の持続時間を決定する粒子径のみが異なる。標準的インスリンとは異なり、ウルトラレンテインスリンは、作用の開始が非常に遅く延長した (「

平坦な」) ピークを有する。これらは、1日中インスリンの低い基底濃度を提供することを支持するが、これらの長い半減期が最適用量を求めるのを困難にしており、そして定常状態の濃度が達成されるまでに数日の治療を必要とする。ウシおよびブタのウルトラレンテインスリンは、ヒトのウルトラレンテインスリンよりも作用の延長した経過を有する。負荷用量として正常1日用量3回の治療から開

始して、次に1日1回または2回の注射を行うことが推奨される。

インスリンは、修飾のために利用可能な3つのアミノ基と6つのカルボキシル基を有する。本発明のインスリン誘導体は、インスリンAおよびB鎖で1つまたはそれ以上の上記ラジカル(i)～(iv)により、1つまたはそれ以上のGly<sup>A1</sup>およびPhe<sup>B1</sup>ラジカルの末端アミノ基で、Lys<sup>B29</sup>のε-アミノ基で、Asn<sup>A21</sup>およびThr<sup>B30</sup>の末端カルボキシル基で、および/またはGlu<sup>A4</sup>、Glu<sup>A17</sup>、Glu<sup>B13</sup>、Glu<sup>B21</sup>の遊離カルボキシル基で置換されている。さらに、こうして置換されたカルボキシルおよび/またはアミノインスリン誘導体は、1つまたはそれ以上の官能基(i)～(iv)により、残基Thr<sup>A8</sup>、Ser<sup>A9</sup>、Ser<sup>A12</sup>、Tyr<sup>A14</sup>、Tyr<sup>A19</sup>、Ser<sup>B9</sup>、Tyr<sup>B16</sup>、Tyr<sup>B26</sup>、Thr<sup>B27</sup>およびThr<sup>B30</sup>の1つまたはそれ以上の遊離ヒドロキシル基でさらに置換されていてもよい。

本発明の1つの好ましい実施態様において、インスリン誘導体は、1つまたはそれ以上のFmoc残基により、Gly<sup>A21</sup>およびPhe<sup>B1</sup>の遊離末端アミノ基で、および/またはLys<sup>B29</sup>のε-アミノ基で置換されており、こうしてインスリン分子のA<sup>1</sup>、B<sup>1</sup>および/またはB<sup>29</sup>位に1～3個のFmoc置換基を有するインスリン誘導体、詳細にはGly<sup>A1</sup>-N-(Fmoc)<sub>1</sub>-、Phe<sup>B1</sup>-N-(Fmoc)<sub>1</sub>-およびLys<sup>B29</sup>-N-(Fmoc)<sub>1</sub>-インスリン、Gly<sup>A1</sup>、Phe<sup>B1</sup>-N-(Fmoc)<sub>2</sub>-、Gly<sup>A1</sup>、Lys<sup>B29</sup>-N-(Fmoc)<sub>2</sub>-およびPhe<sup>B1</sup>、Lys<sup>B29</sup>-N-(Fmoc)<sub>2</sub>-インスリン、およびGly<sup>A1</sup>、Phe<sup>B1</sup>、Lys<sup>B29</sup>-N-(Fmoc)<sub>3</sub>-インスリンが得られる。

活性化Fmoc、例えば9-フルオレニルメチル-N-ヒドロキシスクシンイ

ミド (Fmoc-Osu) とのインスリンの反応により、HPLC法により容易に分割可能な個々に純粋な形態で得られる、モノー、ジーおよびトリー-N-Fmoc-インスリンが生成する。唯一の生成物としてジー-N-Fmoc-インスリンを得るために、1つの遊離アミノ基が最初に例えばt-Boc基により保護され、保護されたインスリン誘導体は過剰のFmoc-Osuと反応し、そして次に保護基が脱離して、目的のジー-N-Fmoc-インスリンが得られる。糖尿病

患者に投与されると、モノー、ジーおよびトリー-N-Fmoc-は、本来のインスリンに変換されて、インビボで種々の期間（延長を含む）にわたる抗糖尿病作用が得られる。

インスリン (C-Fm) のカルボキシル基だけの置換のために、すなわち、末端Asn<sup>A21</sup>およびThr<sup>B30</sup>、およびGlu<sup>A4</sup>、Glu<sup>A17</sup>、Glu<sup>B13</sup>およびGlu<sup>B21</sup>残基において、インスリン分子の遊離アミノ基を、例えばt-Boc基により最初に保護し、次に3工程の反応（ここでは、（1）遊離カルボキシル基を、例えば、O-ニトロフェノールまたはN-ヒドロキシースクシニミドとの反応により活性エステル基に変換し；（2）9-フルオレニルメタノールとの活性化エステル基の反応をイミダゾールの存在下で行い；そして（3）保護t-Boc基を脱離する）を行う。代替法では、N, N'-ジシクロヘキシカルボジイミド、9-フルオレニルメタノールおよび4-ジメチルアミノピリジンによるカルボキシル基の1工程の直接エステル化、続いてt-Boc基の脱離を伴う。

アミノおよびカルボキシル基 (N-Fmoc, C-Fm) の両方が置換されたFmoc-インスリン誘導体を目的とするとき、最初にN-Fmoc誘導体をFmoc-Osuにより調製し、次にN-Fmocインスリンを活性エステルに変換し、続いて上述のように9-フルオレニルメタノールと反応させる。

カルボキシルおよびヒドロキシル官能基 (C-Fm, O-Fmoc) が置換されたFm、Fmoc-インスリン誘導体の調製のために、最初にアミノ基をt-Bocにより保護し、C-Fmインスリン誘導体を上記のように調製し、続いて9-フルオレニルメトキシカルボニルクロリドと反応させ、そして保護N-t-Boc基を脱離する。

アミノ、カルボキシルおよびヒドロキシル官能基 (N, O-Fmoc, C-Fm) が置換された Fm、Fmoc-インスリン誘導体の調製のために、N-Fmoc、C-Fmインスリンを上記のように調製し、次に 9-フルオレニルメトキシカルボニルクロリドと反応させる。

本発明の修飾インスリンは、本来の、組換えまたは突然変異ヒト、ブタまたはウシインスリンのような、ヒトに使用するために適切な任意のインスリンから調製することができる。突然変異インスリンの例は、B16-Tyr→Hisヒト

インスリン類似体 (カーズホルム (Kaarsholm) ハルドビグセン (Ludvigsen) 、1995年)、およびB28およびB29位の本来のアミノ酸配列が保存されている  $\text{Lys}^{\text{B28}}\text{Pro}^{\text{B29}}$  ヒトインスリン類似体 (インスリンリスプロ (lispro)) である。インスリンリスプロは、ヒトインスリンと効力は等しいが、皮下注射部位からの吸収はより迅速である (キャンベル (Campbell) ら、1996年)。好ましい実施態様において、インスリンは、本来のまたは組換えヒトインスリンである。

本発明のモノ-N-Fmoc-インスリン誘導体は、[ポリ (GlutYr)] リン酸化測定法により測定すると、本来のインスリンの 40~80% の生物学的効力を有する。ジーおよびトリー-N-Fmoc-インスリン誘導体は、[ポリ (GlutYr)] リン酸化測定法により測定すると、それぞれ本来のインスリンの 2~9% および <1% の生物学的効力を有する。正しい割合で適正に使用されると、これら 3 つの原型は、原理的に、現在糖尿病の皮下治療に適用される迅速作用性、中期作用性および長期作用性インスリンの従来の混合物を置換することができる。インスリンに関する側面において、本発明は、本発明の 1 つまたはそれ以上のインスリン誘導体および薬剤学的に許容される担体を含む薬剤組成物を提供する。長期作用性のために、本組成物は、好ましくは N-(Fmoc)<sub>3</sub>-インスリンまたは N-(Fmoc)<sub>2</sub>-インスリン誘導体単独または両方の混合物を含む。薬剤組成物は、例えば、経口処方としてまたは皮下注射のための、任意の適切な剤型で提供することができる。

この同じ側面の別の実施態様において、本発明は、糖尿病患者に有効用量の本

発明の1つまたはそれ以上のインスリン誘導体を投与することを含む、糖尿病の治療法に関する。好ましい実施態様において、誘導体は、5～8日の間隔で投与される、本来のまたは組換えヒトN-(Fmoc)<sub>3</sub>-インスリンまたはN-(Fmoc)<sub>2</sub>-インスリンのいずれか、または両方の混合物である。必要であれば、Fmoc-インスリン誘導体による治療は、迅速作用性インスリンの毎日の投与で完了する。

長期治療のために、インスリンは主として皮下注射により投与される。皮下投与される長期作用性インスリンによる現在の治療は、加えた物質が皮下注射の部

位で潜在的に拡散しうるという事実のため、個々の糖尿病患者間で吸収に大きな変動があることが欠点である。本発明は、インスリン分子自体に「組み込まれた」低下した溶解度を持つインスリン誘導体を提供する。このため、ヒトの皮下吸収の大きな変動を排除し、また類似体の混合による妨害を最小化または排除さえすることが期待される。3つのN-(Fmoc)-インスリン原型の適正な混合物は、迅速作用性インスリンの必要を、N-(Fmoc)<sub>2</sub>およびN-(Fmoc)<sub>3</sub>-インスリンの徐放作用と結合させる（これらは全て、干渉作用なしに混合することができる）ため、延長した期間にわたって作用を持続しうる。

この同じ側面の別の実施態様において、本発明の組成物は、モノ、ジおよびトリーニ-Fmoc-インスリン誘導体の混合物を含む。N-(Fmoc)<sub>3</sub>-インスリンは、基本的に長期作用性インスリンであり；N-(Fmoc)<sub>1</sub>-インスリンは、[ポリ(Glu<sub>4</sub> Tyr)]リン酸化測定法により測定すると、40～80%生物学的に活性であり、かつ水溶液中で高い溶解度を示し、そしてN-(Fmoc)<sub>2</sub>-インスリンは、[ポリ(Glu<sub>4</sub> Tyr)]リン酸化測定法により測定すると、2～9%生物学的に活性であり、かつ水溶液中で溶解性が低い。3つの全ての類似体は、37℃で生理学的pH値でインキュベーションすると完全に活性なインスリンに戻る。従って、3つの類似体の適正な混合物は、現在亜鉛とプロタミンを含有する製剤との標準的インスリンの複数注射により達成される、迅速作用、中期作用および長期作用を与える。

本発明の他の側面では、プロドラッグは、抗糖尿病薬、抗炎症薬、抗菌薬、抗

ウイルス薬、抗新生物薬および抗高血圧薬、さらには免疫学的障害、皮膚科学的障害および神経学的障害の治療のための薬物を含むが、これらに限定されないヒトまたは獣医学的用途の薬物から誘導される。

本発明の薬剤組成物は、プロドラッグまたは薬剤学的に許容されるその塩、および薬剤学的に許容される担体を含む。ヒトおよび動物への薬物の任意の適切な投与経路、例えば、従来の注射、体内移植、経口、直腸内または局所投与が本発明では予想される。これらの製剤は、当業者に公知の従来法により、例えば、「レミントンの製剤科学 (Remington's Pharmaceutical Science)」、エー・アル・ジェンナロ (A. R. Gennaro) 編、第17版、1985年、マック出版社

(Mack Publishing Company)、イーストン (Easton)、ペンシルバニア州、米国に記載されるように調製することができる。

ここで本発明は、以下の非限定的な例により説明される。

### 例

#### 生物学的方法：

##### (i) ストレプトゾトシン (S T Z) 処理ラットの調製

オスのウイスターラット (180~200g) をワイズマン科学研究所 (Weizmann Institute of Science) のホルモン研究部 (Department of Hormone Research) から供給された。糖尿病は、マイエロビッチ (Meyerovitch) ら、1987により新たに調製した0. 1Mクエン酸緩衝液 (pH 4. 5) 中のストレプトゾトシン (55mg/kg 体重) の溶液の単回静脈内注射により誘導した。

(ii) インスリン受容体チロシンキナーゼの濃縮調製物は、マイエロビッチ (Meyerovitch) ら、1990、により記載されるようにラット肝臓膜から入手した。簡単に述べると、肝臓をプロテイナーゼインヒビターの存在下でホモジナイズし、1%トリトンX-100で可溶化して、遠心分離した。上清をコムギ麦芽凝集素 (WGA) -アガロースカラム (シグマ (Sigma) ) に通した。吸着したインスリン受容体部分を、0. 1%トリトンX-100、10%グリセロール、および0. 15M NaClを含有する50mM ヘペス緩衝液 (pH 7. 4) 中の0. 3M N-アセチル-D-グルコースアミンで溶出した。インスリンお

およびインスリン誘導体の生物学的効力を以下の測定法 (iii) および (iv) により評価した。

(iii) 脂質生成 (無傷の脂肪細胞の脂質への標識グルコースの取り込み)

本質的にロッドベル (Rodbell) 、1964、の方法によりラット脂肪細胞を調製した。オスウィスターラットの脂肪パッドをはさみで小片に切り、3mlの、NaCl、110mM; NaHCO<sub>3</sub>、25mM; KCl、5mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、1.2mM; CaCl<sub>2</sub>、1.3mM; MgSO<sub>4</sub>、1.3mM; および0.7% BSAを含有するKRB緩衝液 (pH 7.4) に懸濁した。激しく振盪しながらカルボゲン (carbogen) (95% O<sub>2</sub>、5% CO<sub>2</sub>) の雰囲気下で25ml柔軟プラスチック瓶中でコラゲナーゼ (1mg/ml) により消化を行った。次に5mlの緩衝液を

加えて、細胞をメッシュスクリーンに通した。次に細胞を室温で浮遊させて15mlプラスチック試験管中で数分間静置し、そして下の緩衝液を除去した。この操作 (懸濁、浮遊、および下の緩衝液の除去) を3回繰り返した。

脂肪細胞懸濁液 ( $3 \times 10^5$  細胞/ml) をプラスチックバイアルに分配 (1バイアル当たり0.5ml) し、カルボゲンの雰囲気下で37°Cで60分間、インスリンの非存在下または存在下で、0.2mM [U-<sup>14</sup>C] グルコースと共にインキュベートした。脂質生成は、トルエンを主成分とするシンチレーション液を加える (1バイアル当たり1.0ml) ことにより終わらせて、抽出した脂質中の放射活性を計数した (ムーディー (Moody) ら、1974年)。典型的な実験ではインスリン刺激脂質生成はベースラインより4~5倍高かった (ベースライン  $3 \times 10^5$  細胞/h当たり  $2000 \text{ cpm}$ ; Vインスリン  $3 \times 10^5$  細胞/h当たり  $8,000 \sim 10,000 \text{ cpm}$ )。この測定法において、インスリンは、脂質生成をED<sub>50</sub>値 = 0.15 ± 0.03ng/mlで刺激する (シェクター (Shechter) とロン (Ron)、1986年)。ED<sub>50</sub>値 = 1.5ng/mlを示すインスリン類似体は、本来のホルモンの~1%の生物学的効力を有すると考えられる。

(iv) 受容体チロシンキナーゼ活性測定

この測定法において、インスリンは、それ自体の受容体を活性化して、4:1

モル比でL-グルタミン酸とL-チロシンを含有するランダムコポリマー [ポリ(Glu<sub>4</sub>Tyr)] をリン酸化する。標準酵素測定法混合物 (50 mM ヘペス (pH 7.4) - 0.1% トリトンX-100 中最終容量 60 μl) は、WGA 精製インスリン受容体 (5 μg タンパク質)、20 mM MgCl<sub>2</sub>、2 mM MnCl<sub>2</sub>、100 μM ATP および種々の濃度 (1 ng/ml ~ 10 mg/ml) のインスリンまたはインスリン誘導体を含有していた。22°Cで30分の予備インキュベーション後、ポリ(Glu<sub>4</sub>Tyr) を加える (最終濃度 0.7 mg/ml) ことにより反応を開始し、これを22°Cで20分間進行させ、EDTA (20 mM) を加えることにより終了させた。ポリGlu<sub>4</sub>Tyr 中のホスホチロシン含量を、ホスホチロシンに対する特異的モノクローナル抗体 (最終希釈 1:100,000) および<sup>125</sup>I-BSA-ホスホチロシン結合体を使用する放射免疫測定法により定量した。この特別な測定法において、インスリンは、20 ± 3 ng/ml の濃

度で最大の半分の作用を促進する。ED<sub>50</sub> 値 = 2 mg/ml を示すインスリン類似体は、本来のホルモンの ~ 1% の生物学的効力を有すると考えられる。

#### 例1. N-Fmoc-インスリン誘導体の調製

##### (a) 合成

ヒトインスリン (100 mg、17.2 μmol) (バイオテクノロジーージェネラル (Biotechnology-General)、レホヴォト (Rehovot)、イスラエルから寄贈を受けた) は、17.4 mg (172 μmol) トリエチルアミンを含有する 4 ml の分析等級のジメチルホルムアミド (DMF) に懸濁した。次に Fmoc-OSu (58 mg、172 μmol) を加えた。均一な反応混合物を 25°Cで 20 時間攪拌して、次に溶液が混濁するまで酢酸エチルを加えて、続いて沈殿が完了するまでエーテルを加えた。遠心分離により溶媒を除去し、沈殿物をエーテルで 2 回および水で 2 回洗浄した。この操作により、モノ、ジおよびトリ-N-Fmoc-インスリン誘導体の混合物が得られ、これを分取用 HPLC により分離および精製した。モノ修飾N-Fmoc-インスリン誘導体は、粗生成物固体をイソプロパノールで洗浄することにより、ジおよびトリ修飾誘導体から分離することができる。

## (b) N-Fmoc-インスリン誘導体の単離と精製

粗生成物固体を、HPLC充填済みカラム（メルク（Merck）、リクロソーブ（LiChrosorb）RP-18 [7 μm] を含有するリクロスカート（LiChroCART）250-10 mm）を取り付けた逆相HPLC（スペクトラーフィジックス（Spectra-Physics）SP8800液体クロマトグラフィーシステム）に付した。H<sub>2</sub>O中の0.1%トリフルオロ酢酸（TFA）（溶液A）とアセトニトリル：H<sub>2</sub>O（75：25）中の0.1%TFA（溶液B）から線形勾配が生成した。流速は1ml/分とした。N-（Fmoc）<sub>1</sub>-インスリン誘導体は、21.1、21.9および22.8分の保持時間でカラムから出現し、N-（Fmoc）<sub>2</sub>-インスリン誘導体は26.3、27.1および27.7分の保持時間で、そしてN-（Fmoc）<sub>3</sub>-インスリンは31.5分の保持時間で出現した。21～23分、26～28分および31.5分に対応する画分をプールし、凍結乾燥して化学的に性状解析した。21～23分（モノ修飾インスリ

ン）および26～28分（ジ修飾インスリン）に対応する画分は、それぞれ個々のモノ-Fmocおよびジ-Fmoc-インスリン誘導体までさらに精製した。インスリン分子に結合したFmoc基の量は、CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>中の50%ピペリジンによる既知量のN-Fmoc-インスリン誘導体の処理により、301nmで分光測光法で求めた。

## (c) N-Fmoc-インスリン誘導体の化学的性状解析

HPLC法による分取的分離により、7つのN-Fmoc-インスリン誘導体が得られた。これは、それぞれ3つのモノ修飾、3つのジ修飾および1つのトリ修飾誘導体を含む（表I）。保持時間と各化合物の収率表Iに示す。異なるN-（Fmoc）<sub>2</sub>-インスリン（保持時間=27.7分）およびGly<sup>A1</sup>、Phe<sup>B1</sup>、Lys<sup>B29</sup>-N-（Fmoc）<sub>3</sub>-インスリンは、質量スペクトルを含むいくつかの方法により性状解析した（表I）。

(d) Phe<sup>B1</sup>、Lys<sup>B29</sup>-N-（Fmoc）<sub>2</sub>-インスリンの合成

生物検定法により、 $\text{Phe}^{\beta 1}$ 、 $\text{Lys}^{\beta 29}-\text{N}-\text{(Fmoc)}_2$ -インスリンが、長期作用性インスリンとして特に適していることが明らかになったため、これを合成するための代替法を計画した。 $\text{Gly}^{\alpha 1}$ 残基は、1当量の二炭酸ジ-tert-ブチルおよび溶媒としてDMSO/Et<sub>3</sub>N(20:1)を使用して、計画した実験条件下で $\text{t-Boc}$ 基により特異的に保護した。HPLC法による分離後、 $\text{Gly}^{\alpha 1}-\text{N-Boc}$ -インスリンは、溶媒としてDMFおよび塩基としてDIEAを使用して、過剰のFmoc-OSu(10当量)と反応させた。TFAで処理し、HPLCで精製して、良好な収率(～50%)で $\text{Phe}^{\beta 1}$ 、 $\text{Lys}^{\beta 29}-\text{N}-\text{(Fmoc)}_2$ -インスリンを生成させた。

(e)  $\text{N-Fmoc}$ -インスリン誘導体の生物学的性状解析

本発明の $\text{N-Fmoc}$ -インスリン誘導体のいくつかの特徴は、表IIおよびIIIに要約する。水溶液への誘導体の溶解度は、修飾の増加と共に低下した。 $\text{N-}(Fmoc)_1$ -インスリンは、本来のインスリンよりわずかに溶解性が低下しているだけであるが、一方 $\text{N-}(Fmoc)_3$ -インスリンは、本来のホルモン

より約20倍も溶解性が低い。生物学的効力も同様に誘導体化が進むにつれて低下した。すなわち、モノ、ジおよびトリ- $\text{N-Fmoc}$ -インスリンは、[ポリ( $\text{Glu}^{\alpha 4}$  Tyr)]リン酸化測定法により判定すると、それぞれ本来のインスリン生物学的効力の40～80%、2～9%および<1%を示す。無傷のラット脂肪細胞による脂質生成の高感度生物学的測定法により、 $\text{Fmoc}$ -インスリン誘導体は、非常に低い生物学的効力を示す。すなわち、 $\text{Gly}^{\alpha 1}-\text{N-Fmoc}$ -インスリンおよびジ- $\text{N-Fmoc}$ -インスリンは、脂質生成測定法を使用すると、それぞれ本来のインスリン生物学的効力の4.7%および0.4～1.4%を示す(表III)。7つ全ての誘導体は、pH 8.5で2日間のインキュベーションにより本来のホルモンに戻る。このことは、完全な生物学的効力の回復(表IIおよびIII)、および分析HPLC法による分離に際しての本来のホルモンピーク(保持時間=15分)の出現を伴う誘導体のピークの消失により証明された。

表I： $\text{N-Fmoc}$ -インスリン誘導体の化学的性状解析

誘導体	保持時間 (HPLC), 分 <sup>a</sup>	収率 <sup>b</sup> (%)	モル Fmoc /モル インスリン	Fmoc挿入の位置	質量スペクトル (分子量) 計算値 実測値 [M+H] <sup>+</sup>
N-(Fmoc) <sub>1</sub> - インスリン	21.1	3	0.8	Gly <sup>A1</sup>	
N-(Fmoc) <sub>1</sub> - インスリン	21.9	6	1.2	Lys <sup>B29</sup>	
N-(Fmoc) <sub>1</sub> - インスリン	22.8	4	0.9	Phe <sup>B1</sup>	
N-(Fmoc) <sub>2</sub> - インスリン	26.3	12	1.7	Gly <sup>A1</sup> , Lys <sup>B29</sup>	
N-(Fmoc) <sub>2</sub> - インスリン	27.1	6	2.1	Gly <sup>A1</sup> , Phe <sup>B1</sup>	
N-(Fmoc) <sub>2</sub> - インスリン	27.7	14	1.9	Phe <sup>B1</sup> , Lys <sup>B29</sup>	6252 6255
N-(Fmoc) <sub>3</sub> - インスリン	31.5	30	3.4	Gly <sup>A1</sup> , Lys <sup>B29</sup> , Phe <sup>B1</sup>	6474 6475

注：アミノ酸分析を利用して全ての F m o c 誘導体の正しい組成を確認した。

<sup>a</sup> 60%溶液A（水中0.1% TFA）と40%溶液B（アセトニトリル：水（75：25）中の0.1% TFA）から40分（1ml/分の流速）で100%溶液Bまで形成された線形勾配を使用して、メルク（Merck）、リクロスファー（LiChrospher）100RP-8（5μm）カラムにより確立した。

<sup>b</sup> HPLCにより得られた純粋な物質に基づく。

表II：F m o c - インスリン誘導体のいくつかの代表的特徴

誘導体	由来	Fmoc挿入の位置	水性緩衝液の外見(pH7.4)	水性緩衝液への溶解度(pH7.4, mg/ml)	生物学的効力(%)	インキュベーション後の生物学的効力(2日, 37°C, pH8.5)
本来のインスリン	ヒト		清澄	~4以上	100	100
N-(Fmoc) <sub>1</sub> -インスリン	ヒト	Gly <sup>A1</sup>	ほぼ清澄	~3	40±2	95
N-(Fmoc) <sub>1</sub> -インスリン	ヒト	Lys <sup>B29</sup>	ほぼ清澄	~3	78±4	94
N-(Fmoc) <sub>1</sub> -インスリン	ヒト	Phe <sup>B1</sup>	ほぼ清澄	~3	76±4	95
N-(Fmoc) <sub>2</sub> -インスリン	ヒト	Gly <sup>A1</sup> , Lys <sup>B29</sup>	混濁	~2	2±1	93
N-(Fmoc) <sub>2</sub> -インスリン	ヒト	Gly <sup>A1</sup> , Phe <sup>B1</sup>	混濁	~2	3±1	97
N-(Fmoc) <sub>2</sub> -インスリン	ヒト	Phe <sup>B1</sup> , Lys <sup>B29</sup>	混濁	~2	9±2	95
N-(Fmoc) <sub>3</sub> -インスリン	ヒト	Gly <sup>A1</sup> , Lys <sup>B29</sup> , Phe <sup>B1</sup>	非常に混濁	~0.2	<1	98

注：インスリン様効力は、実験の項に記載される両方の生物学的測定法により求めた。

表III：脂質生成測定法を用いるいくつかのN-Fmocインスリンの生物学的効力および活性化の経時変化（無傷のラット脂肪細胞による）

誘導体	ED <sub>50</sub> 脂質生成 ng/mL	相対生物学的効力(%)	pH8.5, 37°Cでのインキュベーション後の活性(%)		
			9時間	20時間	45時間
本来のインスリン	0.2-0.4	100			
Gly <sup>A1</sup> -N-Fmoc-インスリン	7	4.7	50	100	
Gly <sup>A1</sup> , Lys <sup>B29</sup> -N-(Fmoc) <sub>2</sub> -インスリン	44	0.4	10	20	97
Gly <sup>A1</sup> , Phe <sup>B1</sup> -N-(Fmoc) <sub>2</sub> -インスリン	30	1.1	18	40	100
Phe <sup>B1</sup> , Lys <sup>B29</sup> -N-(Fmoc) <sub>2</sub> -インスリン	12.3	1.4	10	20	98

### 例2. N-Fmoc-インスリンの生物活性

(a) pH 7.4 での N-Fmoc-インスリンの活性化の経時変化

糖尿病ラットにおける N-Fmoc-インスリンの抗糖尿病価の試験の前に、

その再活性化（本来のホルモンへの変換）速度を、試験管中で試験した。誘導体を、10%ジメチルスルホキシドを含有するヘペス緩衝液（50mM、pH 7.4）に溶解し、37°C（すなわち、生理学的pHと体温）でインキュベートした。本来のインスリンと比較した生物学的効力の測定の前に、所定の時点でアリコートを採取した。生物活性を、インスリン受容体チミジンキナーゼ活性化（上記セクション(iv) 生物学的操作に記載の無細胞測定法）と、(ii) 生物学的操作に記載の無傷のラット脂肪細胞中の脂質生成の刺激とにより評価した。結果を図1に示す。半最大活性化は、 $t_{1/2} = 14$ 日のN-(Fmoc)<sub>3</sub>-インスリンについて起き、21日のインキュベーション後にはほとんど完全な活性化が明らかであった。

一般に、pH 7.4でのN-(Fmoc)<sub>2</sub>-インスリンの活性化速度の方が速かった。N-(Fmoc)<sub>3</sub>-インスリンでみられた6日間の遅延期間は、N-(Fmoc)<sub>2</sub>-インスリンでは見られなかった。すなわち、N-(Fmoc)<sub>3</sub>-インスリンは、よりゆっくり加水分解されるFmoc残基を有し、これが類似体の再活性化を制限しているようである。現実的な観点から、2つの類似体の混合物は、早期および後期をカバーして長期間活性なインスリンを放出することを意味する。比較的活性なモノ修飾Fmoc-インスリンは、pH

7.4で $t_{1/2} = 5$ 日で完全な生物学的効力を回復した。

いったん循環流中に達すると、N-(Fmoc)<sub>2</sub>-インスリンおよびN-(Fmoc)<sub>3</sub>-インスリンは、長期にわたって低いベース濃度のホルモンを提供すると予測される。これは主に、不活性な誘導体から活性な短命の本来のホルモンへの変換速度により支配されているかも知れない。幸いにも、N-(Fmoc)<sub>2,3</sub>-インスリンは、活性化速度が遅い（図1に示す）。速度が速い（突然）と（すなわち、時間単位ではなく分単位）、低血糖になったであろう。

Phenyl, Lys<sup>B29</sup>-N-(Fmoc)<sub>2</sub>-インスリンは、[ポリ(Glu<sub>4</sub> Tyr)]リン酸化測定法により測定すると9%の生物活性を有し、本来のインスリンとN-(Fmoc)<sub>3</sub>-インスリンの間の中間の溶解度を示す。N-(Fmoc)<sub>3</sub>-インスリンと異なり、N-(Fmoc)<sub>2</sub>-インスリンの本来のホル

モンへの変換は、図1に示すようにインキュベーション後まもなく（数時間以内）始まる。すなわち、 $N-(Fmoc)_2$ -インスリン（もともと活性が高い）は、投与後の作用の出現が速いと予想される。すなわち、 $N-(Fmoc)_2$ -インスリンと $N-(Fmoc)_3$ -インスリンの正しい組合せが、単回投与後迅速な発現と長期作用を特徴とするベースインスリン放出の理想的な処方であり、本発明の1つの好適な実施態様である。

表IV: STZラットの毎日の体重増加に及ぼすPhenylalanine, Lysine-N-(Formyl)-の効果

群	内容	毎日の体重増加 グラム/ラット (最初の3日間)
A (n = 5)	ビヒクルのみ (2.0ml、20% DMSO/ラット) を投与された STZ ラット	2.0±0.2
B (n = 5)	NPH-ヒトインスリン (フムリンN) (3 mg/ラット) を単回皮下投与された STZ ラット	12.0±2
C (n = 5)	N-(Fmoc) <sub>2</sub> -インスリン (3 mg/ラット) を単回皮下投与された STZ ラット	11.5±1.3

(b) 正常ラットへの  $\text{Phe}^{\text{B1}}$ ,  $\text{Lys}^{\text{B29}}$ -N-(Fmoc)<sub>2</sub>-インスリンの単回腹腔内投与の効果

(Fmoc)-インスリンの長期作用性は、生物学的条件下でのその本来のホルモンへの遅い変換に由来することをさらに確認するために、追加のインビボ測定法を計画した。この測定法は、循環流中のインスリン（またはインスリン誘導体）の皮下投与後の長期作用性を反映している。正常ラットに、本来のインスリン、NPH-インスリン、および(Fmoc)-インスリン(3mg/ラット)を単回腹腔内注射で投与し、その血中グルコースレベルを3日間追跡した。結果を図2に示す。すなわち、本来のインスリン(図3)とNPH-インスリン(図2)は、それぞれ約12時間および15時間にわたって低血糖症を誘導した。低血糖症からの回復は、 $t_{1/2}$ がそれぞれ8時間と10時間で起きた。(Fmoc)-インスリンは、約48時間にわたって血中グルコースレベルを低下させ、低血糖症からの回復は $t_{1/2}$ が26時間で起きた。これらの結果は、(Fmoc)-

c)  $\text{Zn}$ -インスリンの長期作用は、その固有の性質に由来し、N P H-インスリンの通常の機序（すなわち、注射部位での沈殿と循環流への溶解-進入速度の遅さ）によるものではない、という我々の考えを支持している。予想されるように、この測定法で血中グルコースレベルを低下させる本来のインスリンとN P H-インスリンの能力の差は、皮下法による投与と比較すると小さい。この事実は、腹腔内に存在する大量の液体に帰因し、従って $\text{Zn}$ -結晶性インスリンが速く変換されてモノマー型を与える。

他の2つの(Fmoc)<sub>2</sub>-インスリン誘導体である[Gly<sup>A1</sup>, Lys<sup>B29</sup>]と[Gly<sup>A1</sup>, Phe<sup>B1</sup>]を合成し、この測定法で評価した。結果（データは示していない）は、両方の誘導体について $t_{1/2}$ が22～24時間で、Phe<sup>B1</sup>, Lys<sup>B29</sup>-N-(Fmoc)<sub>2</sub>-インスリンと同様に長期作用を示した。

(c) N-(Fmoc)<sub>3</sub>-インスリンはタンパク質分解に対して耐性である。本来のインスリンまたはN-(Fmoc)<sub>3</sub>-インスリン(50mMヘペス(pH 7.4)、10%DMSO中でそれぞれ1mg/ml)を、37°Cでインキュベートした。次にキモトリプシンとトリプシン(それぞれ0.5%w/w)を加えた。所定の時点でアリコートを採取して、分析HPLC法を行なった。本来のインスリンピーク(保持時間15分)とN-(Fmoc)<sub>3</sub>-インスリンピーク

(保持時間31.5分)の面積の低下により、分解パーセントを測定した。結果を図4に示す。

N-(Fmoc)<sub>3</sub>-インスリンは、pH 7.4でキモトリプシンとトリプシンによるタンパク質分解に対して極めて耐性であった。タンパク質分解は、本来のインスリンとN-(Fmoc)<sub>3</sub>-インスリンについて $t_{1/2}$ が、それぞれ0.5と7.5時間で進んだ。

例3. STZ-糖尿病ラットへのPhe<sup>B1</sup>, Lys<sup>B29</sup>-N-(Fmoc)<sub>2</sub>-インスリンとN-(Fmoc)<sub>3</sub>-インスリンの単回皮下投与の効果

STZラットは、インビボインスリン療法を評価するための優れたモデルである。このモデルでは、組織学的検査(ペダーソン(Pederson)ら、1989、が記載)によると、約90%の $\beta$ -細胞機能がストレプトゾトシンにより破壊され

ている。このラットは、低インスリン血症（正常インスリンレベルの10～30%を有する）、高血糖症（>300mg/dl；対照ラットの正常グルコースレベルは90～100mg/dlである）、および異化性（catabolic）である。外見からわかる症状は、「病的」外観であり、液体摂取と尿排泄量が3～4倍増加している。1日の体重増加は、対照ラットの正常な体重増加の10～20%（0.3～0.8g/日/ラット）に低下している。STZラットの組織の病理的变化は、非常に大きい。より顯著な生理学的变化の一部は、グリコーゲン代謝の主要酵素の活性の低下、肝臓グリコーゲンの欠乏、末梢組織における多くのグルコース輸送物質の低下、およびインスリンに対する応答の増加を伴わないインスリン結合能の増加である。

この糖尿病性ラットモデルでは、便利なインスリン療法は、1週間にわたるインスリンの連続的投与である（5単位/日/ラット）。この治療法は、血中グルコースレベルを正常にし、糖尿病性ラットを同化性（anabolic）状態に戻し、高血糖症や低血糖症により誘導される病状の多くを改善する。迅速作用性（正規）インスリンの単回投与は、数時間有効なだけである。また7日間の治療プロトコールが終わると、24～30時間以内に高血糖症が再発する。

N-（Fmoc）<sub>3</sub>-インスリンは長期の抗糖尿病作用を有するかどうかを評価するために、糖尿病誘発の2週間後、STZラットに、本来のインスリン（A

群、25単位、1mg、1.0ml H<sub>2</sub>O-10%DMSOに溶解、n=4）、またはN-（Fmoc）<sub>3</sub>-インスリン（B群、1.0ml H<sub>2</sub>O-10%DMSOに溶解、n=4）の単回皮下注射を行なった。血中グルコースレベルと毎日の体重増加を、7日間追跡した。

結果を図5に示す。各点は、4匹のラットの血漿グルコースの平均士標準誤差を示す。B群の循環グルコースレベルは、有意に低かった。すなわち、B群では投与後2日目から出発して、グルコースレベルは90～110mg/dlと低く、この低いグルコースレベルは6日目まで続いた。7日目に、循環グルコースレベルにおいて、2群のラット間で有意差はなかった。N-（Fmoc）<sub>3</sub>-インスリンを投与したラットは、「健康な」外見をしていた。毎日の体重増加は、B群で

はほとんど3倍であり、A群とB群でそれぞれ0.57±0.08と1.43±0.14g/ラット/日であった（データは示していない）。すなわち、N-（Fmoc）<sub>3</sub>-インスリンの単回投与は、4日間（出現が約2日間遅れた後に）継続する長期かつ満足できる抗糖尿病作用を示した。このインビボの長期作用は、この誘導体が受容体介在エンドサイトーシスから逃れ、タンパク質分解に対して耐性であることにより説明できる。さらにN-（Fmoc）<sub>3</sub>-インスリンは、水溶液に大体不溶性である。すなわちヒトでは、全体的な継続作用は、新しい成分（すなわち、寿命の長い共有結合的に修飾した不活性インスリン誘導体であって、本来のホルモンにゆっくり変換される）とともに皮下投与後、古い治療成分の置換（すなわち、「組み込まれた」不溶性インスリンの漸進的な溶解）により進む。このインスリン誘導体は不活性であるため、低血糖症が起きる恐れもなく大量に投与することができる。

Phe<sup>B1</sup>, Lys<sup>B29</sup>-N-（Fmoc）<sub>2</sub>-インスリンが実験的糖尿病ラットの血中グルコースレベルを低下させるのに有効であることを試験するために、糖尿病の誘導の9日後にSTZ処理ラットに、N-（Fmoc）<sub>2</sub>-インスリンを単回皮下注射（A群、3mg/ラット、2.0ml 20%DMSO、n=5）、または長期作用性インスリン（NPH-ヒトインスリン、フムリン（Humulin）N、HI-310）（B群、ラット1匹あたり0.75ml（3mg）、n=5）の単回皮下注射を行なった。C群（n=5）には、ビヒクルのみ（20%DMSOを2

ml）投与した。血中グルコースレベルを毎日測定した。

結果を図6に示し、ここで水平の点線は、対照ラットの血漿グルコースの算術平均を示す。図6に示すように、HPLC精製したPhe<sup>B1</sup>, Lys<sup>B29</sup>-N-（Fmoc）<sub>2</sub>-インスリンの単回皮下投与は、4日間にわたって正常血糖を誘導し、これらの異化性STZラットモデルの毎日の体重増加を上昇させた（表II-1）。N-（Fmoc）<sub>2</sub>-インスリンは、市販の（不溶性）長期作用性調製物として有効であった。迅速作用性（可溶性）インスリンは、この実験系で数時間だけ、血中グルコースレベルを低下させるのに有効である（データは示していない）。

)。この調製物は水溶液 (pH 7.4) 中でかなり安定であり、懸濁液は皮下注射では正確に投与できないため、これが不溶性N-(Fmoc)<sub>3</sub>-インスリンより有利な点である。

例4. (2-スルホ) Fmoc-インスリンの生物活性

(a) (2-スルホ) Fmoc-インスリン (Sulfonyl Fmoc-インスリン) の合成

Fmoc-インスリンの疎水性を低下させ、こうして水性緩衝液中の溶解度を上昇させ、インスリンへの再変換速度を修飾するために、Fmoc基自身を修飾した。これは、フルオレン環に極性基（好ましくは、荷電基）（例えば、ハロゲン、ニトロ、カルボキシル、アミノ、アンモニウム、およびスルホ基）を導入することにより行われる。求電子的置換反応では、フルオレンはまず2位で攻撃され、そして一般に、9位の置換基（例えば、CH<sub>2</sub>OCOO-OSu）の性質は、置換の配向には影響を与えない。すなわち、0°Cでジクロロメタン (DCM) 中の0.9当量のクロロスルホン酸でFmoc-OSuを処理すると、(2-スルホ) Fmoc-OSuが高率に得られた（式(i)、2位でR<sub>1</sub>=SO<sub>3</sub>H、R<sub>2</sub>=R<sub>3</sub>=R<sub>4</sub>=H、A=OCOO-OSu）。1当量以上で処理すると、フルオレン環の7位でも置換が起きる。

活性な(2-スルホ) Fmoc-OSuエステルをインスリンのアミノ基に結合させて、インスリンに(2-スルホ) Fmoc基を導入した。反応は水性緩衝液 (pH 7.4) と過剰の試薬（～20当量）中で行なった。透析と凍結乾燥後、生成物を水溶性にした。HPLC分析は、質量スペクトル (m/z 6411)

で測定した時、1つの主要な生成物、おそらく(Sulfonyl Fmoc)<sub>2</sub>-インスリンが優勢であることを示した。反応をアセトニトリル/水 (1:1) 中で行うと、主要な生成物は、質量スペクトル (m/z 6713) により測定されたように(Sulfonyl Fmoc)<sub>3</sub>-インスリンであった。

(b) (2-スルホ) Fmoc-インスリンの活性化の経時変化

(Sulfonyl Fmoc)<sub>2</sub>-インスリンを、pH 8.5 (0.1M NaHCO<sub>3</sub>)

で37°Cで36時間、またはpH 7.4 (50 mMヘペス緩衝液) で10日間、それぞれ  $t_{1/2}$  値は12~15時間と6日間でインキュベートすると、完全に待ちホルモンに戻った。これは、分析HPLC法を使用することにより、本来のホルモンのピークの出現とともにインスリン誘導体のピークの消失により証明された。 (*Sul*fmoc)<sub>2</sub>-インスリンの本来のホルモンへの加水分解は、 (*Fmoc*)<sub>2</sub>-インスリンの加水分解と比較して速かった (pH 7.4, 37°Cで21日間)。

(*Sul*fmoc)<sub>2</sub>-インスリンは0.5%生物活性を有し、水中で良好な溶解度を示す。pH 8.5で37°Cでインキュベートすると、 (*Sul*fmoc)<sub>2</sub>-インスリンは、生物学的効力 (ラット脂肪細胞中の脂質生成の測定) の時間依存性増加により判断すると、  $t_{1/2}$  値が4~6時間で、無傷の本来のインスリンに戻る。

(c) 正常ラットへの (2-スルホ) *Fmoc*-インスリンの単回腹腔内投与の効果

(*Sul*fmoc)<sub>2</sub>-インスリンの長期作用活性を評価するために、皮下吸収の下流に、正常ラットに、本来のインスリン、NPH-インスリン、または (*Sul*fmoc)<sub>2</sub>-インスリンを単回腹腔内注射した。血中グルコースレベルを2日間追跡した。図3は、 (*Sul*fmoc)<sub>2</sub>-インスリンが24時間にわたって低血糖症を誘導したことを示す。低血糖症からの回復は、  $t_{1/2}$  値 = 14時間で起きた。迅速およびNPH-インスリンの場合、これらの  $t_{1/2}$  値は、それぞれ8時間 (図3) と10時間 (図2) になった。すなわち、 (*Sul*fmoc)<sub>2</sub>-インスリンの単回投与は、中間の抗糖尿病作用を与え、すなわち迅速またはNPH-インスリンより1.5~2倍長かった。これらの結

果は、インビトロすでに見いだされた (*Sul*fmoc)<sub>2</sub>-インスリンの加水分解速度の加速に一致する。すなわち、フルオレン環の2位のスルホン酸基は、9位のプロトンの放出速度を増加させ、従って *Sul*fmoc 残基の加水分解を2~3倍増加させた。種々の塩基に対する *sul*fmoc 基の安定性に関する初期の研究は、親の系よりも塩基感受性が大きいことを示した。さらに、グリシ

ンからのS u l f m o c基の放出の速度定数は、例えばF m o c基よりはるかに大きかった（約30倍）。従って、インスリンにS u l f m o c基を導入することによる溶解度の上昇は、逆にこの誘導体の長期作用効果を低下させる。従って、受容体介在エンドサイトーシスと分解を免れることによる、長期持続性抗糖尿病作用の原理は、s u l f m o c-インスリン誘導体についても真実である。

インスリンからのS u l f m o c基の除去速度の増大は、インスリン投与のいくつかの応用（例えば、中間調製物）において有効である。そのような調製物は市販の調製物に比較して、明らかに水性緩衝液中で完全に溶解性であるという利点を有する。さらに、多様な酸性または極性を有する他の基を、フルオレン環に導入することができる。従って、F m o c基に導入される基のタイプや数の調節は、修飾インスリンの溶解度および再活性化速度を決定することができる。

例5. アミノ末端およびカルボキシ末端修飾インスリン（N-F m o c-およびC-F m -インスリン）誘導体の調製

N-（F m o c）<sub>3</sub>-インスリン（64.5mg；10μm o l；60μm o l）のカルボン酸残基、すなわち4つの鎖内G1uおよび2つのC-末端残基について）を、o-ニトロフェノール（250μm o l；35mg）またはN-ヒドロキシスクシンイミド（250μm o l；28mg）とともに、8mlのジメチルホルムアミド（D M F）（ラボスキャン（Lab. Scan.）、ダブリン、アイルランド）に溶解し、溶液を4℃に冷却した。0.5mlのD M F中のN, N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド（D C C；250mmol、5.3mg）の溶液を加え、反応混合物を4℃で1時間維持し、次に室温で6時間維持した。沈殿したN, N'-ジシクロヘキシル尿素を遠心分離して除去し、N-（F m o c）<sub>3</sub>-インスリンの、それぞれo-ニトロフェニルまたはN-ヒドロキシスクシンイミドエステルを、乾燥した氷冷したエーテルにより沈殿させた。固体を乾燥エーテルで洗浄し、乾燥し、8mlのD

M Fに溶解した。1mlのD M F中の9-フルオレニルメタノール（250μm o l；50mg）とイミダゾール（25μm o l；17mg）の溶液を加えた。反応混合物を室温で一晩放置した。乾燥エーテルで沈殿させて、62mgのN-（F m o

c)  $\beta$ -インスリン、C-(Fm)<sub>n</sub>-インスリンを得た。主要な反応生成物は、N-(Fmoc)<sub>3</sub>-インスリンのヘキサ-9-フルオレニルメチルエステルC-(Fm)<sub>6</sub>であった(n=6)。

例6. カルボキシ末端Fm-インスリン(C-Fm-インスリン)の調製

t-ブチルオキシカルボニル(t-Boc)<sub>3</sub>-インスリンの調製のために、ジ-tetra-t-ブチルジカルボネート(56mg、258μmol)を、DMF(4ml)中のインスリン(100mg、17.2μmol)とトリエチルアミン(17.4mg、172μmol)の氷冷した攪拌懸濁液に加えた。反応混合物を室温まで加温し、5時間攪拌した(徐々に清澄になる)。次に、溶液が濁るまで、酢酸エチルを加え、次にエーテルを加え、そして沈殿物を遠心分離し、エーテルで2回洗浄した。得られた粗生成物固体(95mg)を、さらに精製することなく使用した。分析HPLCは、27.5分で溶出する1つの主要な生成物を示した。

この生成物を10mlのDMFに溶解し、上記したo-ニトロフェノールまたはN-ヒドロキシスクシンイミドで処理して、対応する活性エステルを得た。これらを、上記のイミダゾールの存在下で9-フルオレニルメタノールと反応させ、乾燥エーテルで沈殿させた後、N-(t-Boc)<sub>3</sub>、C-(Fm)<sub>n</sub>-インスリンを粉末として得た(87mg)。粉末を真空中でP<sub>2</sub>O<sub>5</sub>で乾燥し、次に5mlのトリフルオロ酢酸で室温で1時間処理し、N-末端t-Boc保護基を除去した。この操作の間、インスリン誘導体のほとんどは溶解した。氷冷した乾燥エーテルを加えると、粉末が得られ、これを遠心分離して単離し、乾燥エーテルで完全に洗浄した。生成物(主に、C-(Fm)<sub>6</sub>-インスリン)の収率は79mgであった。

例7. (Fmoc)<sub>1</sub>-ヒト成長ホルモン(Fmoc<sub>1</sub>-hGH)の調製

通常の生理学的条件下で、健常被験体のhGHレベルは、パルス的に数回(昼と夜)上昇する。hGHは短命の分子種である。現在の治療プロトコールでは、hGHを日に1回投与し、これは数時間のみ有効であると考えられている。昼と

夜の24時間hGHの閾値ベースのレベルを与える長期作用性(除放性)hGH調製物は、非常に好ましい。

本来のhGH (バイオテクノロジージェネラル (Biotechnology General) 、レホヴォット (Rehovot) 、イスラエル; 9. 2mg) を、0. 1M NaHCO<sub>3</sub> (2. 0ml; pH 8, 5) に溶解し、DMSO (0. 1ml) を加え (DMSOの最終濃度、~5%) 、溶液を0°Cに冷却した。次に、10μlの1当量のFmoc-OSu (DMSO中18. 5mg/mlのストック溶液から採取した) を加え、穏やかに攪拌しながら、0°Cで30分反応を進めた。次にさらに10μl (1当量のFmoc-OSuを含有する) を加え、30分後、混合物を7°Cで一晩、水に対して透析した。半分取用HPLCにより、本来のhGH (全体の~20% ; 保持時間30分; RP-8カラム; 250×10mm; メルク (Merck) ) と修飾Fmoc-hGH (全体の~80% ; 保持時間32分) に対応する、2つの大きなタンパク質ピークが得られた。

表Vは、0. 1MのNaHCO<sub>3</sub> (pH 8, 5) 中で37°Cでインキュベートする、Fmoc-hGH (1mg/ml) から本来のhGHへの変換を示す。所定の時点でアリコートを取り、分析HPLC操作を行なった (RP-8カラム) 。Fmoc-hGHからhGHへの変換を、本来のhGHに対応するピーク面積の増大により評価した。

表Vに示すように、Fmoc-hGHは、本来のホルモンの受容体結合能の15%を有する。pH 8. 5 (37°C) で約6日間、またはpH 10, 5 (37°C) で4日間、Fmoc-hGHをインキュベートすると、HPLC分析と受容体結合測定法により判断すると、完全に活性な本来のhGHを与えた。

表V. 37°CでのインキュベーションによるFmoc-hGHからの本来のhGHの生成

化合物	処理	ヨウ素化ホルモンを置換する能力 <sup>(1)</sup> (%)	hGHへの変換 <sup>(2)</sup> (%)
hGH		100	
Fmoc-hGH		15	
Fmoc-hGH	1日, pH10.5	25	
Fmoc-hGH	4日, pH10.5	100	
Fmoc-hGH	1日, pH8.5		23
Fmoc-hGH	2日, pH8.5		62
Fmoc-hGH	6日, pH8.5		100

(1) ヨウ素化hGHの置換は、ガートラー(Gertler)ら、1984年、により行った。本来のhGHは、Fmoc-hGHに適用した条件(pH10.5、37°C、4日)下で完全に安定であった。

(2) Fmoc-hGH (1mg/ml) は0.1M NaHCO<sub>3</sub> (pH8.5) 中で37°Cでインキュベートした。所定の時点でアリコートを採取し、分析HPLCに付した。本来のhGHへのFmoc-hGHの変換は、本来のhGHに対応するピーク面積の増大により評価した。

例8. N-Fmoc-セフェレキシンとセファレキシン-O-Fmエステルの調製

セフェレキシン [7-(D- $\alpha$ -アミノフェニルアセトアミド)デスマセトキシセファロスボラン酸] は、グラム陰性菌(+)とグラム陽性菌(+)に対して広い活性スペクトルを有する $\beta$ -ラクタム抗生物質である。フルオレニルメチル(Fm)残基を、アミノ基(N-Fmoc-セフェレキシン)またはエステル化(セフェレキシン-O-Fm)によりカルボキシル基に共有結合させて、2つのモノ置換セフェレキシンを調製した。

(i) (a) N-Fmoc-セフェレキシンの調製

ジクロロメタン(DCM; 2.5ml)中のセフェレキシン水和物(シグマ(Sigma)、米国; 50mg、0.144ミリモル)とトリエチルアミン(29mg、0.288ミリモル)の攪拌懸濁液に、DCM(2.5ml)中のFmoc-OSu(145mg、0.432ミリモル)を、5分かけて滴下して加えた。1時間後に清澄になった反応混合物を、室温で一晩攪拌し、その間液は濁った。真空下で

濃縮後、混合物にエーテルを加え、得られる沈殿物を濾過し、エーテルで2回洗浄した。ろ液をDCMに溶解し、酸性化した水(pH~2)、水および食塩水で抽出し、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。溶液を濾過し濃縮した後、エーテルを加えた。沈殿した生成物を濾過し、エーテルで洗浄して、TLC(1-ブタノール:酢酸:水、8:1:1)と分析HPLC法(33分で溶出、同様の条件下で本来のセフェレキシンは6.5分で溶出する)により判断すると、Fmoc-セフェレキシンが純粋な生成物として得られた。質量スペクトル分析(高速原子衝撃、FAB)は、N-Fmoc-セフェレキシンの予測された分子量(M/Z 570.1 [M+H]<sup>+</sup>)を得た。

(i) (b) Fmoc-セフェレキシンの抗菌力

本来のセフェレキシンとFmoc-セフェレキシンの抗菌力の測定のために、黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus*) (0.5ml/ガラス試験管)の希薄懸濁液を含有する試験管を、表VIに記載の処理の前後に、増加した濃度の本来のセフェレキシンまたはFmoc-セフェレキシンの非存在下および存在下で、37°Cで6時間インキュベートした。所定の時点アリコートを採取し、黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus*)の増殖を押さえるその効力について分析した。次に細菌の増殖を、分光学的に700nmで測定して増加した濁度により評価した。

表VI. 本来のセファレキシンとN-Fmoc-セファレキシンの抗菌力

化合物	pH7.4, 37°Cでのインキュベーション	50%の細菌増殖を阻害する濃度(μM) (IC <sub>50</sub> )	抗菌力 <sup>(1)</sup> (%)
本来のセファレキシン	—	0.9	100
本来のセファレキシン	1日	1.5	100
本来のセファレキシン	3日	5.3	100
本来のセファレキシン	6日	18	100
Fmoc-セファレキシン	—	23	6
Fmoc-セファレキシン	1日	15	10
Fmoc-セファレキシン	3日	9	59
Fmoc-セファレキシン	6日	4.5	100

(1) 数字は、測定を通して対照として使用されるセファレキシンの効力を意味

する。インキュベーションは、50 mMヘペス緩衝液、20% DMSO中の本来のセファレキシンまたはN-Fmoc-セファレキシン(100 μg/ml)を用いてpH 7.4で行った。

表VIに示すように、N-Fmoc-セフェレキシンは不活性である(~6%)。6日間(pH 7.4、37°C)プレインキュベートすると、親化合物のHPLCモニタリングと抗菌力の約50%の再獲得により判断した場合、本来のセフェレキシンが得られた。本来のセフェレキシンは、インキュベーションにより実質的に時間依存性の自発的不活性化を受けるが、N-Fmoc-セフェレキシンは、同じ条件に対してはるかに安定である。すなわち、インビボでのN-Fmoc-セフェレキシンの予測される長期作用は、生理学的pHと温度での高い化学的安定性、ならびに分解を免れることに帰因するようである。N-Fmoc-セフェレキシンは、ペニシリナーゼに対する加水分解に対して、親化合物より安定である(データは示していない)。

(ii) セフェレキシン-O-Fmエステル(セフェレキシンフルオレニルメチルエステル)の調製

(a) N-Boc-セフェレキシン

DCM(3ml)中のセフェレキシン水和物(50mg、0.144ミリモル)とトリエチルアミン(29mg、0.288ミリモル)の氷冷した攪拌懸濁液に、DCM(2ml)中のジ-tert-ブチルジカーボネート(94.2mg、0.432ミリモル)を加えた。反応混合物を室温まで加温し、TLC(1-ブタノール:酢酸:水、8:1:1)によりニンヒドリン陽性の出発物質が得られなくなるまで、室温で一晩攪拌した。次に反応混合物をDCM(2.5ml)で希釈し、酸性化した水(pH~2)、水および食塩水で抽出し、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。濃縮後、生成物を石油エーテル(沸点、40~60°C)で沈殿させ、濾過し、再度石油エーテルで洗浄した。生成物は、TLCとHPLC法により均一であった。

(b) -セフェレキシン-O-Fmエステル

DCM(2ml)中のN-Boc-セフェレキシン(25mg、0.056ミリモル)、9-フルオレニルメタノール(22mg、0.112ミリモル)および4-

ジメチルアミノピリジン (13.7 mg, 0.112ミリモル) の氷冷した攪拌溶液に、DCM (1 ml) 中のDCC (23.1 mg, 0.112ミリモル) の溶液を20分間滴下して加えた。反応混合物を室温で一晩攪拌し、溶液をろ過してジシクロヒキシル尿素を除去した。ろ液をDCM (2.5 ml) で希釈し、次に1 MN a  $\text{HCO}_3$  溶液、10%クエン酸、水および食塩水で2回抽出し、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。溶液を蒸発させて、油状の固体を得て、これを石油エーテルで粉碎して、Boc-セフェレキシン-OFm生成物 (TLCとHPLCで確認)を得た。粗生成物固体 (25 mg) を1 mlのTFA:DCM (1:1 v/v) 溶液に溶解して、Boc残基を除去した。室温で20分間放置後、蒸発させてTFAを除去し、固体残渣をイソプロパノールに溶解し、次にこれを蒸発させた。この方法を2回繰り返した。粗生成物固体を石油エーテルで粉碎して、最終的な純粋なエステルを得た (TLCとHPLC法で判断)。

例9. ジー9-（フルオレニルメトキシカルボニル）ポリミキシンB [（Fmoc）<sub>2</sub>-PMXB] の調製

環状ペプチド抗生物質のファミリーの代表的メンバーであるポリミキシンB (PMXB) は、グラム陰性菌 (-) に対して有効である。PMXBは、5つのジアミノ酪酸残基を有し、これは、試薬4-（9-フルオレニルメトキシカルボニルオキシル）フェニルージメチルスルホニウムメチルサルフェート (Fmoc-DSP) を使用して、Fmoc基の挿入により修飾することができる。Fmoc-DSP試薬とペプチドのモル比は、PMXB分子の修飾の程度を決定するであろう。

(Fmoc)<sub>2</sub>-PMXBの調製のために、 $\text{H}_2\text{O}$  (1 ml) 中のPMXB (シグマ (Sigma)、米国; 10 mg、7.2  $\mu\text{mol}$ ) と (Fmoc-DSP; 7.1 mg、14.4  $\mu\text{mol}$ ) の攪拌溶液に、 $\text{NaHCO}_3$  の溶液 (0.1 M、0.15 ml) を滴下して加えた。徐々に濁度を増した反応混合物を一晩室温で攪拌した。得られた沈殿物を遠心分離し、水で2回洗浄し、少量のDMFに溶解し、エーテルで沈殿させて白色の粗生成物固体を得た。

表VII: (Fmoc)<sub>2</sub>-PMXBと本来のPMXBの抗菌力

化合物	処理	50%の細菌増殖を阻害する濃度(μM)	抗菌力 <sup>(1)</sup> (%)
本来のPMXB	——	0.05	100
本来のPMXB	3日, 37°C, pH8.5 <sup>(2)</sup>	0.1	100
本来のPMXB	6日, 37°C, pH8.5 <sup>(2)</sup>	0.2	100
本来のPMXB	3日, 37°C, pH7.4 <sup>(2)</sup>	0.055	100
本来のPMXB	6日, 37°C, pH7.4 <sup>(2)</sup>	0.228	100
(Fmoc) <sub>2</sub> -PMXB	——	5	1
(Fmoc) <sub>2</sub> -PMXB	3日, 37°C, pH8.5 <sup>(2)</sup>	0.125	80
(Fmoc) <sub>2</sub> -PMXB	6日, 37°C, pH8.5 <sup>(2)</sup>	0.2	100
(Fmoc) <sub>2</sub> -PMXB	3日, 37°C, pH7.4 <sup>(2)</sup>	0.227	25
(Fmoc) <sub>2</sub> -PMXB	3日, 37°C, pH7.4 <sup>(2)</sup>	0.35	64

(1) 数字は、測定を通して対照として使用されるPMXBの効力を意味する。

(2) インキュベーションは、1% DMSOを含有する0.1M NaHCO<sub>3</sub>中のPMXB、または(Fmoc)<sub>2</sub>-PMXB(100μg/ml)を用いてpH8.5で行った。

40分で(流速0.8ml/分)70%溶液A(0.1%TFA水溶性)および30%溶液B(アセトニトリル:水、75:25中の0.1%TFA)から100%溶液Bまでの線形勾配を使用して行なった分析HPLC(RP-18; 250×4mm; メルク(Merck))は、39分に溶出する主要な生成物を示した(これらの条件下でPMXBの保持時間は13.5分である)。粗生成物固体を分取HPLCにかけて、純粋な生成物を得た。(Fmoc)<sub>2</sub>-PMXBを質量スペクトル(FAB)で分析すると、この化合物についての予測された分子量(M/Z 1647 [M+H]<sup>+</sup>)が得られた。

(Fmoc)<sub>2</sub>-PMXBと本来のPMXBの抗菌力を、以下のように種々の実験条件下で測定した:大腸菌(E. coli)(ガラス試験管当たり0.5ml)の希薄懸濁液を、(Fmoc)<sub>2</sub>-PMXBと本来のPMXBの濃度の増加有りまたは無しで、37°Cで6時間インキュベートした。所定の時点アリコートを採取し、大腸菌(E. coli)の増殖を停止させる効力について分析し、次に細菌の増殖を700nmでの濁度を測定することにより評価した。

表VIIに示すように、(Fmoc)<sub>2</sub>-PMXBは不活性(～1%)であり(t

$1/2$  値は、pH 8.5 と 7.4 でそれぞれ～3 と～1 日) で、ほとんど活性

の PMXB に加水分解された。

例 10. ピペラシリン-フルオレニルメチルエステル (ピペラシリン-O-Fm ) の調製

ピペラシリン (4-エチル-2,3-ジオキソピペラジンカルボニルアンピシン) は、ペニシリンに関連するスペクトルの広い半合成抗生物質であり、経口投与では有効ではない。

ピペラシリン (遊離カルボキシル) を、ピペラシリンナトリウム塩 (シグマ (Sigma) 、米国) から酢酸エチルで酸性抽出して調製した。ピペラシリン-O-Fm を、上記例 8 のセフェレキシン-O-Fm エステルについて記載したように、1 当量のカルボキシルを 2 当量ずつの 9-フルオレニルメタノール、4-ジメチルアミノピリジンおよび DCC と反応させて合成した。DCM-エーテルから粗生成物固体を再結晶して、TLC と HPLC 法で確認された純粋な生成物を得た。

例 11. Fmoc-プロプラノロールの調製

ベータプロッカーファミリーの代表的なメンバーであるプロプラノロール [1-(イソプロピルアミノ)-3-(1-ナフチルオキシ)-2-プロパノール] は、抗高血圧薬、抗狭心症薬、および抗不整脈薬として使用される。プロプラノロールは、 $\beta$ -アドレナリン作用性受容体に結合するが、これを活性化しない。これらの部位について  $\beta$ -アドレナリンアンタゴニストと競合すると、病的高血圧状態が低下する。患者は、毎日プロプラノロールを経口投与される。しかし、大多数の  $\beta$ -アドレナリンアンタゴニスト (例えば、アセチルブトロール、アテンロール、ベタキソロール、カルテオロール、ナドロール、およびソタロール) は、本質的にやや親水性であり、経口投与された時有効に吸収されない。

Fmoc-プロプラノロールの調製のために、DCM (2.5ml) 中の Fmoc-OSu (170mg、0.50ミリモル) を、ジクロロメタン (DCM、2.5ml) 中の (土)-塩酸プロプラノロール (50mg、0.17ミリモル) とトリエチルアミン (34mg、0.34ミリモル) の攪拌溶液に、5 分かけて滴下して

加えた。

室温で一晩攪拌後、反応混合物を、酸性化した水、水および食塩水で抽出し、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。溶液を蒸発させて、粗生成物固体を得て、次

にこれをヘキサンで粉碎して、Fmoc-プロプラノロールを得た。生成物をTLC（1-ブタノール：酢酸：水、8:1:1）とHPLCにより調べると、純粋であった（同じ条件下でプロプラノロールとFmoc-プロプラノロールの保持時間は、それぞれ16分と51分である）。質量スペクトル（FAB）は、正しいM/Z: 482.2 [M+H]<sup>+</sup>を与えた。

Fmoc-プロプラノロールのβ-アドレナリン作用効力を分析した。結果を図7に示す。新たに調製したラットの脂肪細胞を、イソプロパノール（最終濃度1μg/ml、4μM）と所定濃度のプロプラノロール（白丸）、Fmoc-プロプラノロール（黒丸）、またはpH8.5で37℃で7日間インキュベートしたFmoc-プロプラノロール（四角）とともに37℃で2時間インキュベートした。次に培地に放出されたグリセロールの量を、シェクター（Shechter）、1982、に従って測定した。IC<sub>50</sub>は、イソプロテレノール介在グリセロール放出を最大の半分阻害するN-Fmoc-プロプラノロール誘導体（μM）の量である。

図7に示すように、Fmoc-プロプラノロールは、本来のプロプラノロールの～7%の効力を有する。Fmoc-プロプラノロールをpH8.5(37℃)で7日間インキュベートすると、本来の薬剤のβ-アドレナリン作用効力の50～70%が得られた。この誘導体は実質的に疎水性であり、これは胃腸管吸収を助ける性質である。

## 参考文献

1. Bodanszky, M. and Bednarek, M. (1982) *Int. J. Peptide Protein Res.* 20, 434-37.
2. Burch, R.M., Weizberg, M., Blok, N., Muhlhäuser, R., Martin, D., Farmer, S.G., Bator, J.M., Connor, J.R., Ko, C., Kuhn, W., MCMillan, B.A., Maureen, R., Shearer, B.G., Tiffany, C. and Wilkins, D.E. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88,355-359.
3. Campbell, R.K., Campbell, L.K., White, J.R. (1996) *Ann. Pharmacother.* 30, 1263-71.
4. Gertler, A., Ashkenazi, A. and Madar, Z. (1984) *Mol. Cell Endocrinol.* 34, 51-57.
5. Kaarsholm, N.C. and Ludvigsen, S. (1995) *Receptor* 5, 1-8.
6. Meyerovitch, J., Farfel, Z., Sack, J. and Shechter, Y. (1987) *J. Biol. Chem.* 262, 6658-6662.
7. Meyerovitch, J., Kahn, C.R. and Shechter, Y. (1990) *Biochemistry* 29,3654-3660.
8. Moody, A.J., Stan, M.A., Stan, M. and Gliemann, J. (1974) *Horm. Metab. Res.* 6, 12-16.
9. Pederson, R.A., Ramanadham, S., Buchan, A.M.J. and MCNeill, J.H. (1989) *Diabetes* 38, 1390-1395.
10. Rodbell, M. (1964) *J. Biol. Chem.* 239,375-380.
11. Shechter, Y. (1982) *Endocrinology* 110, 1579-1583
12. Shechter, Y. and Ron, A. (1986) *J. Biol. Chem.* 261, 14945-14950

【図1】

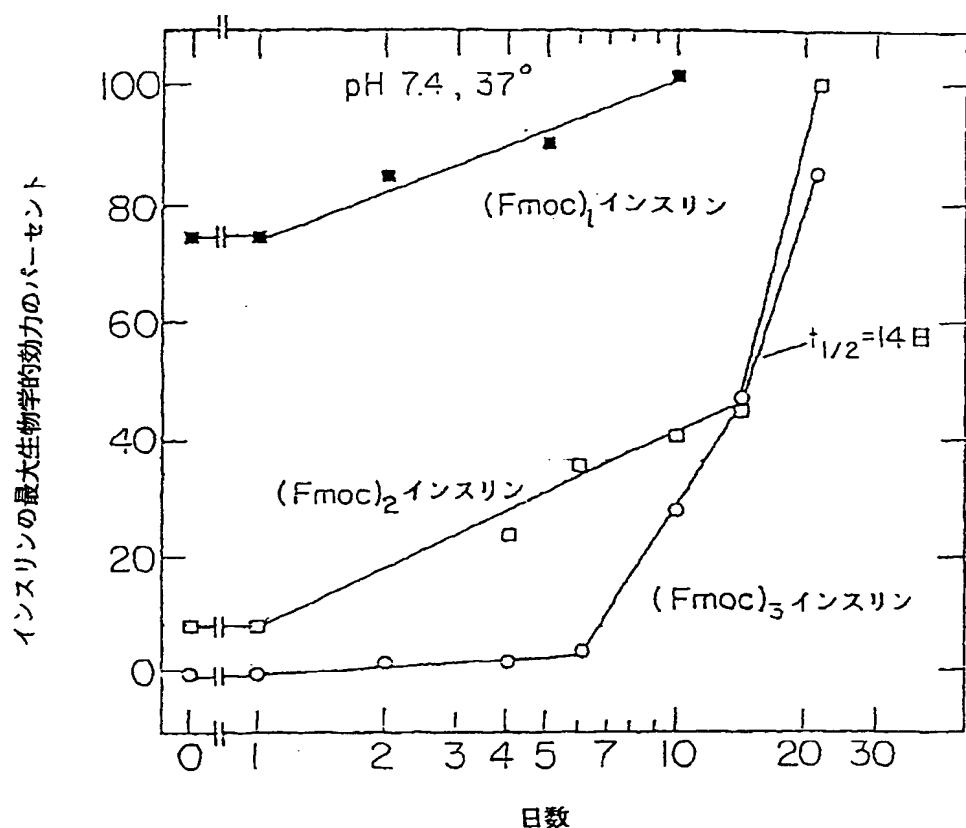


Fig. 1

【図2】

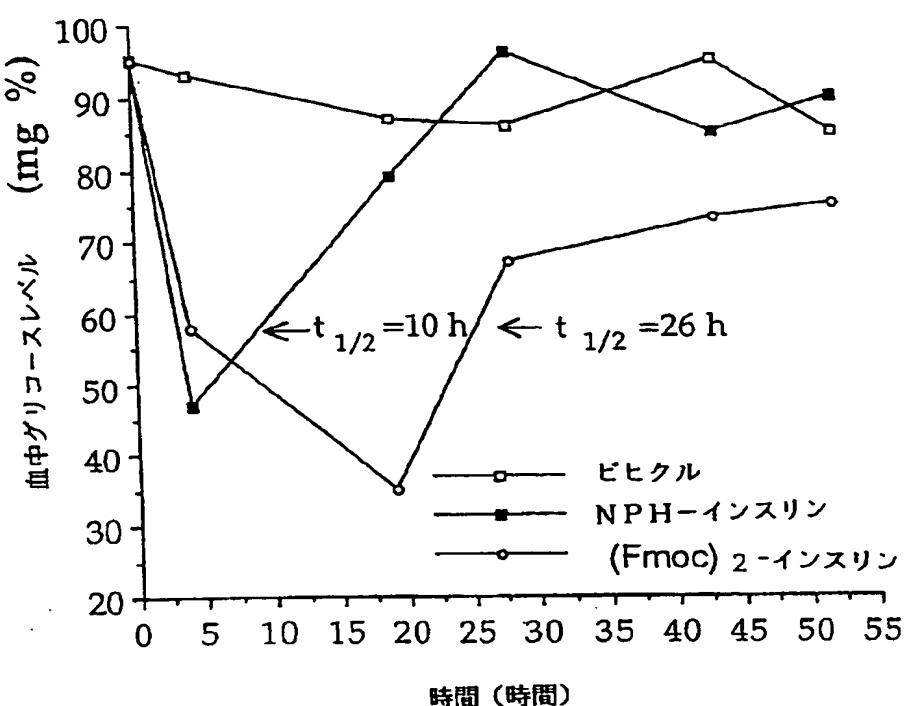


Fig. 2

【図3】

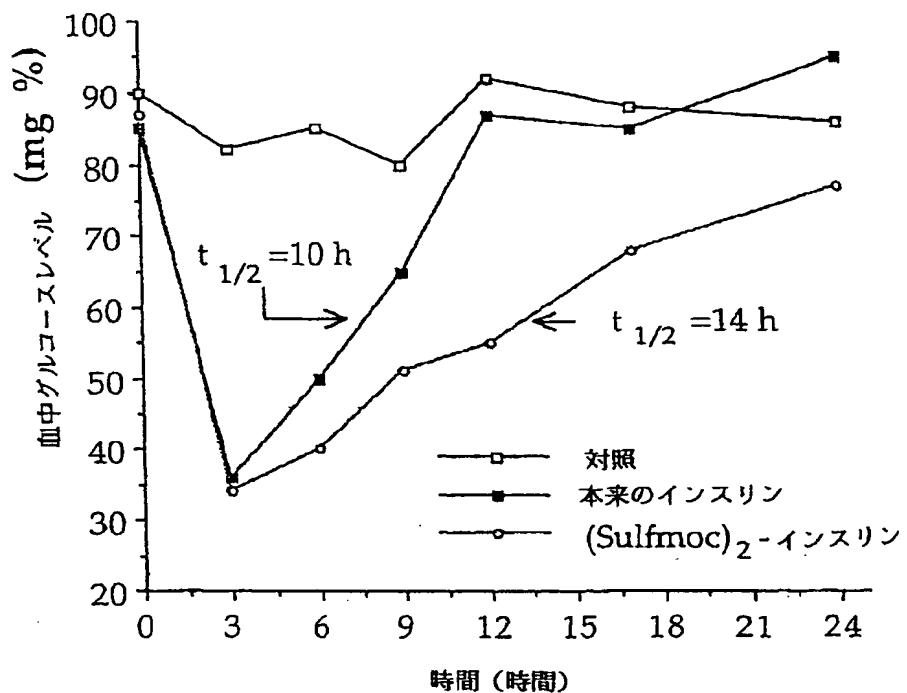


Fig. 3

【図4】

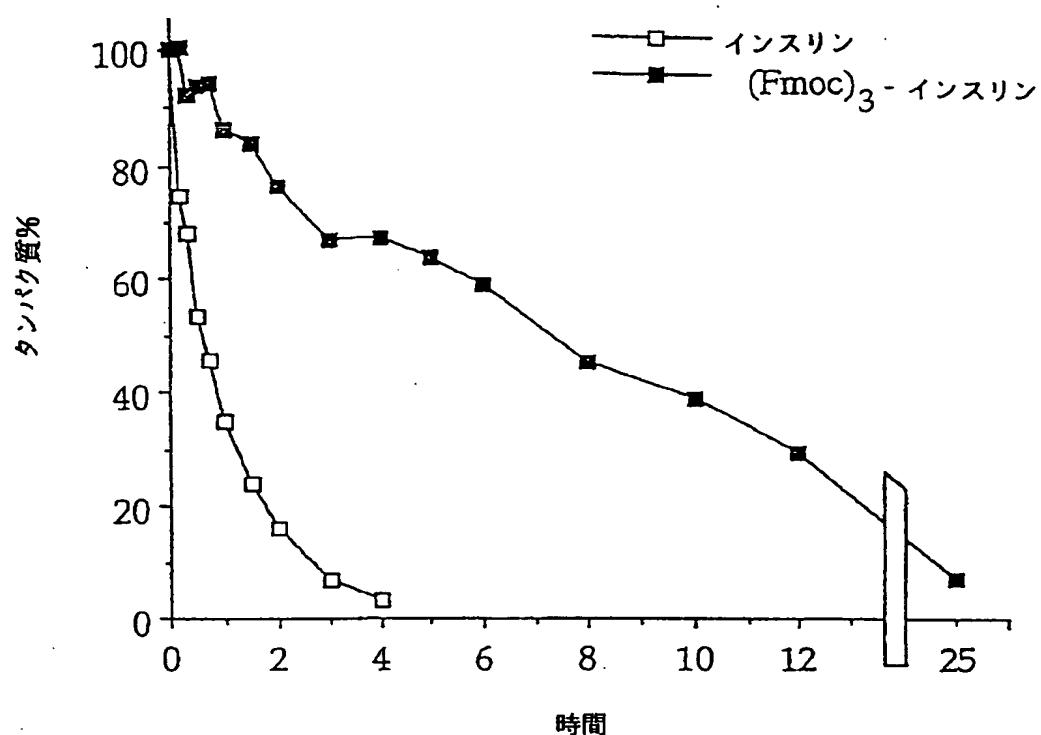


Fig. 4

【図5】

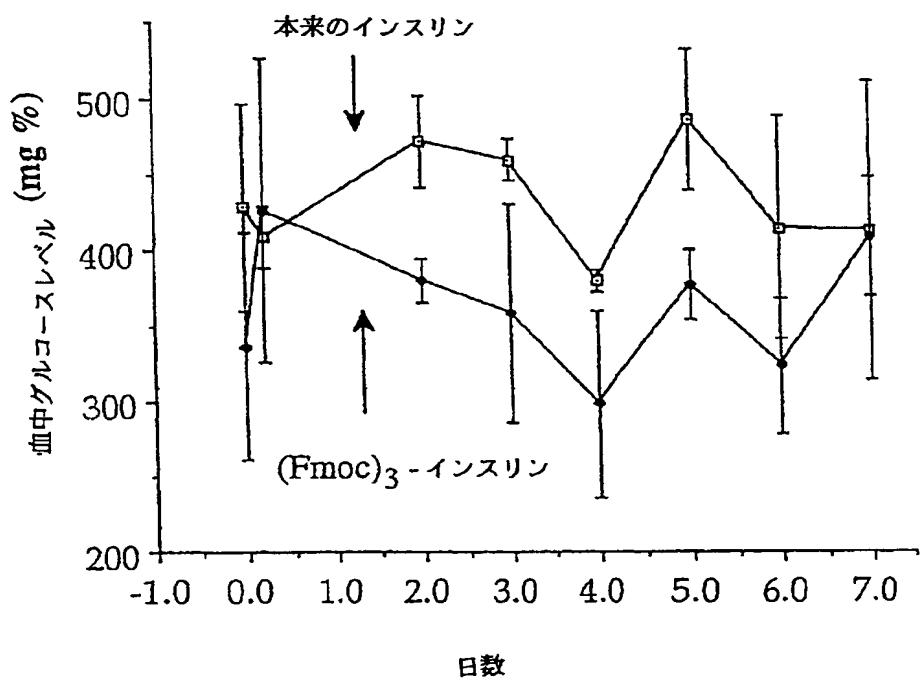


Fig. 5

【図6】

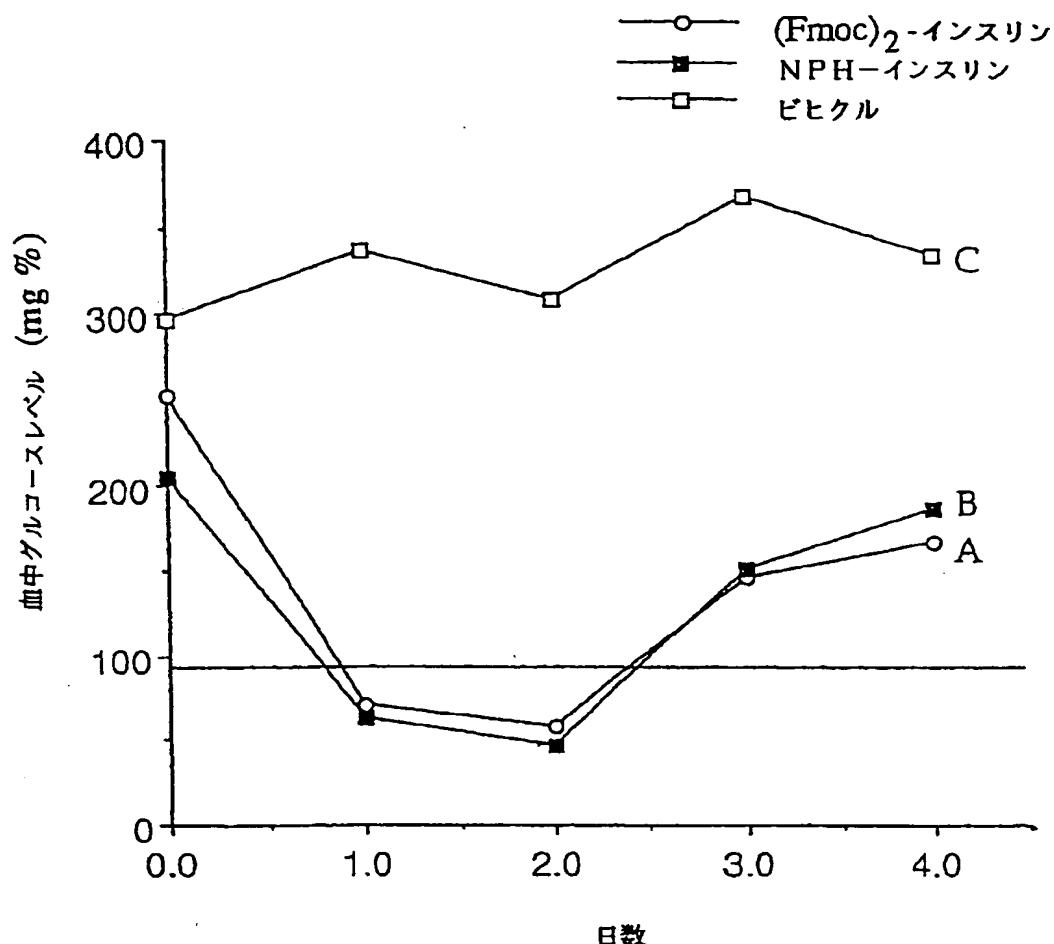


Fig. 6

【図7】

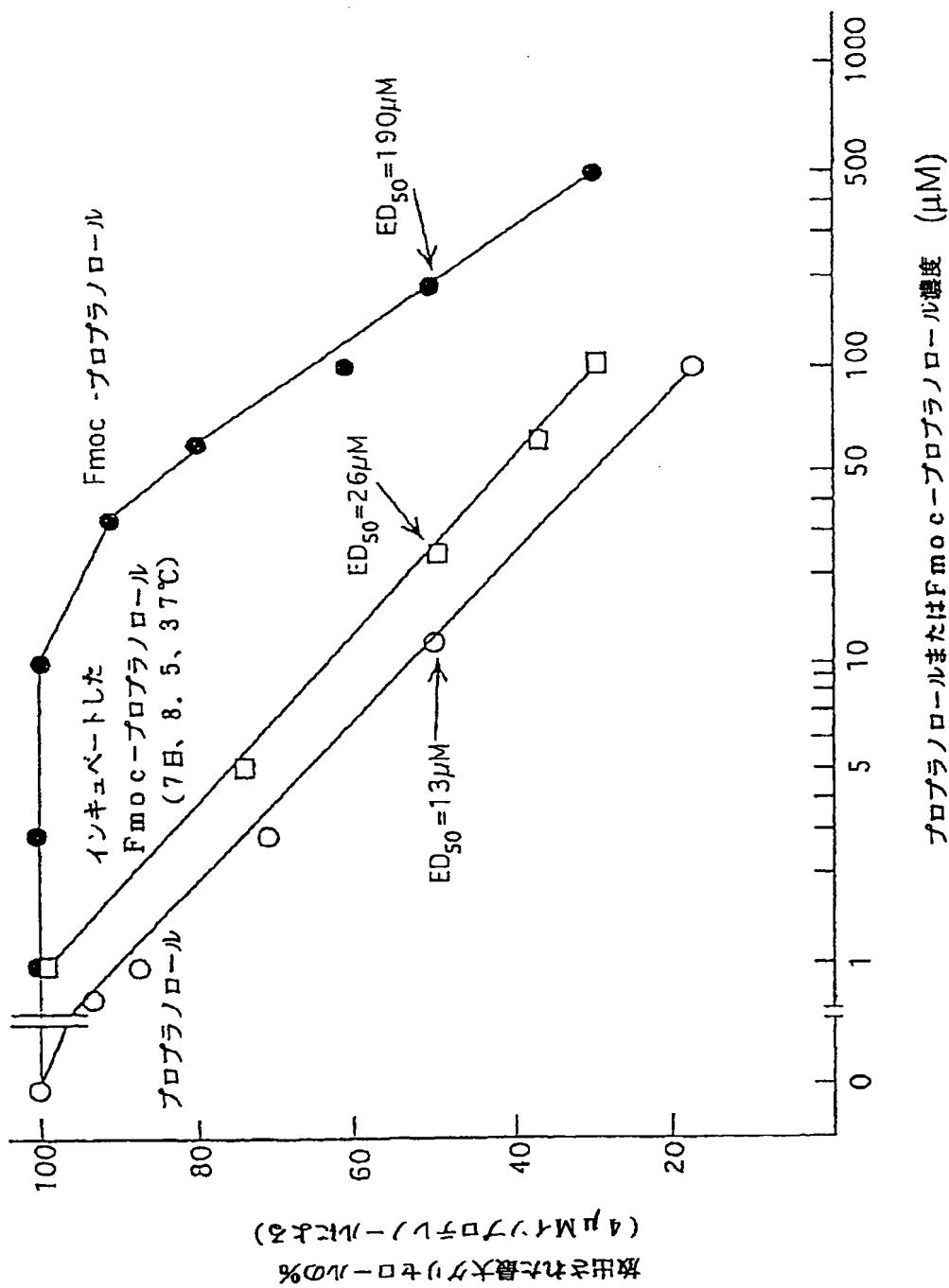


Fig. 7

## 【国际调查报告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.  
PCT/IL 97/00265

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 A61K47/48		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	WO 96 23794 A (ENZON INC) 8 August 1996 see page 30, line 19 - page 32, line 5 ---	1
P,X	WO 96 30332 A (US HEALTH) 3 October 1996 see page 9, line 22 - page 10, line 35; claims 1-13; examples 6,7 ---	1-3
X	WO 96 12505 A (BASF AG ; SCHWEIDEN JUERGEN (DE); HORNBERGER WILFRIED (DE)) 2 May 1996 see examples 1,2 ---	1
A	WO 88 92756 A (SANDOZ AG ; SANDOZ AG (CH); SANDOZ AG (DE)) 21 April 1988 see page 46, line 2-9; example 46 ---	2-27
A	---	1-27
	---	-/-
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
<p>* Special categories of cited documents :</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document not published on or after the international filing date</p> <p>"T" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"C" document relating to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"I" later document published after the International Filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"D" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"W" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"B" document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
23 March 1998	31.03.98	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5515 Patentbox 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 esp nL Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer A. Jakobs	

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/IL 97/00265

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Details of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>DATABASE WPI  Section Ch, Week 9417  Derwent Publications Ltd., London, GB;  Class B04, AN 94-141007  XP0002059622  &amp; JP 06 087 887 A (UPJOHN CO) , 29 March  1994  see abstract</p> <p>-----</p>	1-27
A	<p>LEYER S ET AL: "THE ROLE OF THE  C-TERMINUS OF THE INSULIN B-CHAIN IN  MODULATING STRUCTURAL AND FUNCTIONAL  PROPERTIES OF THE HORMONE"  INTERNATIONAL JOURNAL OF PEPTIDE AND  PROTEIN RESEARCH,  vol. 46, no. 5, 1 November 1995,  pages 397-407, XP000530836</p> <p>-----</p>	2-13,20

Form PCT/ISA210 (continuation of second sheet) (July 1992)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/IL 97/00265

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/219
2.  Claims Nos.: because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3.  Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

## Remark on Protest

 The additional search fees were accompanied by the applicant's protest. No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/IL 97/00265

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/SA/ 218

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

Claims Nos.: -

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

In view of the large number of compounds, which are defined by the general definition(s)/formulae used in claims 1-27, the search had to be restricted for economic reasons. The search was limited to the compounds for which pharmacological data was given and / or the compounds mentioned in the claims, and to the general idea underlying the application. (see Guidelines, chapter III, paragraph 2.3)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No  
PCT/IL 97/00265

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9623794 A	08-08-96	US 5614549 A AU 4913396 A CA 2208841 A EP 0807115 A	25-03-97 21-08-96 08-08-96 19-11-97
-----	-----	-----	-----
WO 9636332 A	03-10-96	US 5688992 A AU 5377696 A CA 2215827 A EP 0820433 A	18-11-97 16-10-96 03-10-96 28-01-98
-----	-----	-----	-----
WO 9612505 A	02-05-96	DE 4437604 A	25-04-96
-----	-----	-----	-----
WO 8802756 A	21-04-88	AU 617986 B AU 7956487 A AU 634664 B AU 8015091 A BE 1003752 A BG 60272 B CH 682632 A CH 680512 A CZ 8805618 A DK 532787 A FI 874495 A FI 950960 A, B, FR 2609991 A FR 2619566 A GB 2199829 A, B GB 2199831 A, B GB 2233652 A, B HR 940990 A HU 210192 B IE 65159 B IL 102184 A JP 3014599 A JP 1921772 C JP 6045639 B JP 63101399 A KR 9616861 B LU 87014 A NL 8702345 A	12-12-91 14-04-88 25-02-93 31-10-91 09-06-92 31-03-94 29-10-93 15-09-92 14-08-96 14-04-88 14-04-88 01-03-95 29-07-88 24-02-89 28-07-88 29-07-88 16-01-91 30-04-97 28-02-95 04-10-95 30-05-94 23-01-91 07-04-95 15-06-94 06-05-88 23-12-96 03-05-88 02-05-88

Form PCT/ISA/2000 Search Report Annex (July 1999)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.  
PCT/IL 97/00265

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 8802756 A		SE 8703938 A	14-04-88
		SI 8811579 A	31-12-95
		SK 561888 A	01-10-96
		SU 1792418 A	30-01-93
		US 5656721 A	12-08-97
		CH 677233 A	30-04-91

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

## フロントページの続き

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	マークコード (参考)
A 6 1 P 31/02		A 6 1 P 31/12	
31/12		37/00	
37/00		43/00	
43/00		A 6 1 K 37/26	

(81)指定国 E P (A T, B E, C H, D E,  
 DK, E S, F I, F R, G B, G R, I E, I T, L  
 U, M C, N L, P T, S E), O A (B F, B J, C F  
 , C G, C I, C M, G A, G N, M L, M R, N E,  
 S N, T D, T G), A P (G H, K E, L S, M W, S  
 D, S Z, U G, Z W), E A (A M, A Z, B Y, K G  
 , K Z, M D, R U, T J, T M), A L, A M, A T  
 , A U, A Z, B A, B B, B G, B R, B Y, C A,  
 C H, C N, C U, C Z, D E, D K, E E, E S, F  
 I, G B, G E, G H, H U, I L, I S, J P, K E  
 , K G, K P, K R, K Z, L C, L K, L R, L S,  
 L T, L U, L V, M D, M G, M K, M N, M W, M  
 X, N O, N Z, P L, P T, R O, R U, S D, S E  
 , S G, S I, S K, S L, T J, T M, T R, T T, T  
 U A, U G, U S, U Z, V N, Y U, Z W

(72)発明者 ガーシュノブ, エイタン

イスラエル国45265 ホド ハシャロン,  
 ブネイ ブリス ストリート 17

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**